Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

DIE WIRKUNG VON BESTANDTEILEN VERBRANNTER HAUT UND IN-VIVO-HAUTVERBRENNUNGEN AUF DIE ATMUNGSAKTIVITÄT VON LEBERMITOCHONDRIEN DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dr. med. dent. HARTMUT FEIFEL
aus Aalen

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0105

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

DIE WIRKUNG VON BESTANDTEILEN VERBRANNTER HAUT UND IN-VIVO-HAUTVERBRENNUNGEN AUF DIE ATMUNGSAKTIVITÄT VON LEBERMITOCHONDRIEN DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dr. med. dent. HARTMUT FEIFEL
aus Aalen

1987

Dekan: Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. H. Schmidt
2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Koslowski

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Dr. K. H. Schmidt für die Überlassung des Themas und die stets hilfsbereite Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. L. Koslowski für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seiner Klinik

und besonders Herrn Dr. G. Bruchelt für die ständige Betreuung und die technische Unterstützung meiner Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Ziel der Untersuchungen	2
2.	ALLGEMEINER TEIL	4
2.1.	Verhalten und Veränderungen der Haut bei Verbrennungen	4
	a) vergleichende Anatomie: Mensch - Maus, Ratte	4
	b) klinische Einteilung	4
	c) intracutanes Temperaturverhalten und Histopathologie	5
2.2.	Thermischer Zerfall biologischer Verbindungen mit Entstehung flüchtiger Substanzen	7
	a) thermischer Zerfall der Proteine	7
	b) thermischer Zerfall der Kohlenhydrate	9
	c) thermischer Zerfall der Triglyceride	10
	d) thermischer Zerfall organischer Substanzgemische	11
2.3.	Mitochondrien - Testsysteme für die Atmungsmessungen	12
	a) Struktur	12
	b) Stoffwechselleistungen	13
	c) Hemmstoffe der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung und Entkoppler	14
3.	MATERIAL UND METHODIK	16
3.1.	Gewinnung der trockenen Destillate	16
3.2.	Operations- und in-vivo-Verbrennungstechnik	17
3.3.	Kreuztransplantationen (Cross-Grafting)	19
3.4.	Isolierung der Mitochondrien	20
3.5.	Aufbau und Funktion der modifizierten Sauerstoffelektrode vom Typ Clark	21

3.6. Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien 24
3.7. Proteinbestimmung 25

4. ERGEBNISSE 28
4.1. Atmungsmessungen an Mitochondrien nicht vorbehandelter Ratten 28
a) Direktinkubation mit trockenen Destillaten 28
b) Direktinkubation mit definierten Substanzen 34
4.2. Atmungsmessungen an Mitochondrien vorbehandelter Ratten mit statistischer Auswertung 36

5. DISKUSSION 42

6. ZUSAMMENFASSUNG 49

7. LITERATURVERZEICHNIS 50

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 58

9. LEBENSLAUF 59

1. EINLEITUNG

Die lokale thermische Schädigung eines Organismus löst verschiedene auf den Ort der Verbrennung begrenzte und Fernwirkungen aus, die sich zur Verbrennungskrankheit addieren (1).

In ihrer Frühphase bewirken die Aufhebung der Schrankenfunktion der Haut und Permabilitätsänderungen eine Plasmaexsudation ins Gewebe mit Wundödem, Elektrolytverschiebungen, Verdunstung großer Flüssigkeitsmengen und eine Erhöhung der Blutviskosität. Die verstärkte Katecholaminausschüttung führt zur Kreislaufzentralisation, Ausbildung von Mikrothromben und mangelnden Sauerstoffversorgung der Gewebe mit nachfolgender metabolischer Acidose (2,3). Heute kann diese ca. 4 Tage dauernde Schockphase durch eine Infusionstherapie mit genauer Elektrolyt- und Flüssigkeitsbilanzierung gegenüber früher relativ erfolgreich behandelt werden.

Trotzdem kann die sich anschließende Spätphase auch heute oft nicht beherrscht werden, so daß bei laborchemisch bereits normalisierten Patienten die Letalität noch immer sehr hoch ist (4,5). Lediglich der Todeszeitpunkt konnte vom 3. auf den 14. posttraumatischen Tag verschoben werden (3).

Für die hohe Letalität werden verschiedene Mechanismen diskutiert: Ateminsuffizienz infolge herabgesetzter alveolärer Oberflächenspannung (6), häufig therapieresistente Sepsis mit sonst kaum pathogenen Keimen, besonders Pseudomonas aeruginosa (7,8,9), Erschöpfung der Energiereserven und Abwehrkräfte; als Komplikationen Verbrennungsanämie, Streß-Ulcera im Magen-Darm-Trakt, Oligurie, Urämie und Energie- und Stoffwechselstörungen infolge Hypermetabolismus und Wärmeverlust (10,3,11).

Bei einer Verbrennung entstehen oft großflächige Nekrosen, die in Kontakt zum Organismus belassen werden müssen. Man nimmt an, daß aus der verbrannten Haut Toxine resorbiert werden, die via Kreislauf an verschiedenen Stellen im Körper Organe schädigen.

Manche dieser Toxine konnten bereits isoliert werden. Rosenthal beschreibt ein myokardspezifisch wirkendes Glykoprotein, das aus verbrühter Haut isoliert werden konnte. Ähnliche Glykoproteine sollen im Serum Verbrannter gefunden worden sein; Literaturangaben zufolge liegt ein Antitoxin vor (12-15). Baxter entdeckte einen nach Verbrennungen im Blut zirkulierenden "myocardial depressant factor", der die Kontraktilität des Herzmuskels herabsetzt (16,17). Fedorow und Mowschew gelang die Isolierung hochmolekularer Verbindungen aus verbrannter Haut, die am Versuchstier toxisch wirkten (18, 19). Von der Arbeitsgruppe um Allgöwer und Schönenberger wurde ein toxischer Lipid-Protein-Komplex aus verbrannter Haut isoliert, das sogenannte Basler Verbrennungstoxin. Dieses entsteht durch Polymerisierung einer nicht toxischen monomeren Vorstufe und soll generalisierte Zellmembranschädigungen hervorrufen (20-22). In unserem Labor konnten durch Verbrennung entstandene niedermolekulare Substanzen nachgewiesen werden, die teilweise stark toxisch waren (23,24).

1.1. Ziel der Untersuchungen

Untersuchungsgröße der vorliegenden Arbeit ist die Atmungsaktivität der Lebermitochondrien von Ratten. Diese wurde an isolierten Mitochondrien, die in einem Puffermedium atmeten, gemessen.

In Teil I der Arbeit wurde untersucht, wie sich die Atmungsaktivität von unbehandelten Mitochondrien durch Zugabe von sogenannten trockenen Destillaten, Extrakten aus verbrannter

Mäusehaut, in vitro beeinflussen ließ. Ferner wurden den unbehandelten Mitochondrien die in unserem Labor bei Verbrennung von Mäusehaut bei 250°C u.a. identifizierten flüchtigen Substanzen Trimethylamin, Schwefelkohlenstoff, Methyläthylketon, Pyrrol zugesetzt (25).

Teil II baut auf der Arbeit von Aprille und Mitarbeitern auf (26). Nach in-vivo-Verbrennung eines ca. 90 cm^2 großen Stücks der Rückenhaut von Ratten bei 250°C wurden ihre Lebern am ersten, zweiten und fünften postoperativen Tag zur Mitochondrienisolierung aufgearbeitet. Außerdem wurden Cross-Transplantationen zwischen verbrannten und unverbrannten Ratten durchgeführt. Die Aufarbeitung der Lebern bei dieser Versuchsreihe erfolgte am 2. postoperativen Tag. Auch bei den in-vivo-Verbrennungen wurde untersucht, ob sich Veränderungen der Atmungsaktivitäten im Sinne einer Reduktion einstellten.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Verhalten und Veränderungen der Haut bei Verbrennungen

a) Vergleichende Anatomie: Mensch - Maus, Ratte

An den Anfang dieses Kapitels sei der Vergleich zwischen menschlicher und Mäuse- oder Rattenhaut gestellt (27-29).

Bei allen drei ist die Reihenfolge der Hautschichten-Epidermis (Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale), Corium (Stratum papillare, Stratum reticulare) - dieselbe. Nach Schumacher (30) läßt sich folgendes Gesetz ableiten: Mit dichterer Behaarung der Haut nehmen Dicke der Epidermis und Ausprägung der Coriumpapillen ab. Während beim Menschen die Haut bis zu 3 mm dick ist (Gesäß, Rücken) (31), sind bei der Maus und der Ratte, an denen in dieser Arbeit die Untersuchungen durchgeführt wurden, das Haarkleid dichter, die Epidermis- und Coriumschichten aber weniger ausgeprägt. Der Bauplan und somit die Reaktion auf Hitzeeinwirkung sind jedoch prinzipiell gleich.

b) Klinische Einteilung

Koslowski unterscheidet 3 Schweregrade von Hautverbrennungen (2).

- Verbrennung ersten Grades: Ödem und Hyperämie der Epidermis
- oberflächliche Verbrennung zweiten Grades: Exsudat zwischen Stratum germinativum der Epidermis und dem Corium, Abheben der Epidermis unter Blasenbildung
- tiefe Verbrennung zweiten Grades: mehr oder weniger tiefreichende Nekrosen unter Einbeziehung des Corium, regenerierbar aus in der Tiefe gelegenen Hautanhangsgebilden
- Verbrennung dritten Grades: Erfassung aller Hautschichten

bis zum subcutanen Fettgewebe (Nekrose) mit Demarkation und Heilung per granulationem mit Narbenbildung

So tritt bspw. Grad 1 bei einer intracutanen Temperatur von 47°C auf, Grad 2 bei 55°C nach 40 sec und die Koagulation von Gewebsproteinen (Grad 3) bei 60°C nach 60 sec (32). Im Prinzip gibt es zwei Arten der Hitzeeinwirkung auf die Haut. Zum ersten können niedere Temperaturen um 50°C bei langer Einwirkung tiefreichende Verbrennungen hervorrufen. Dagegen erzeugen hohe Temperaturen von mehreren Tausend Grad Celsius, deren Wirkungsdauer Sekundenbruchteile beträgt (z.B. Atomblitz), nur oberflächliche Verbrennungen (33,34).

c) Intracutanes Temperaturverhalten und Histopathologie

Greuer beschreibt 3 Zonen der Gewebsschädigung (1):

1. oberflächliche Zone: Temperaturen > 65°C, irreversible Gewebskoagulation, Zellenzyme hitzeinaktiviert
2. mittlere Zone (in die Tiefe der Haut): Temperaturen < 65°C, Zellenzyme nicht hitzeinaktiviert → autolytischer Zellzerfall, fließender Übergang in
3. Zone der entzündlichen Raktion: starke leukozytäre Infiltration.

Koslowski und Krause fanden, daß bei Verbrennung von Textilien auf der Haut Temperaturen von 500 - 700°C erzielt werden, diese in 1 - 2 cm Tiefe aber nur noch 60 - 86°C betragen (32). Das Temperaturprofil in der Haut verläuft also sehr steil. Besonders interessant für die vorliegende Arbeit sind die Untersuchungen von v. Kothen über die Zeitdauer des intracutanen Temperaturanstiegs während einer Verbrennung. In Abhängigkeit von der Dicke der Cutis ergaben sich bei Aufsetzen eines auf 250° C temperierten Metallstempels die folgenden Temperaturen:

Mäusehaut (o,5 mm): nach 7 sec 100°C, nach 50 sec 130°C
Schweinehaut (2 mm): nach 5o sec 100°C, nach 370 sec 130°C.

Das bei 100°C auftretende Plateau in der Temperaturkurve wird mit dem Verdampfen der Gewebsflüssigkeit erklärt (35). Danach verkohlt die ausgetrocknete Haut (36,37). Bei menschlicher Haut mit einer Dicke von o,9 - 3 mm (33,31) werden bei einer Oberflächenverbrennung mit 250°C intracutan 60°C und die damit verbundene Gewebskoagulation schon nach 4o - 60 sec erreicht (36).

Die Verdampfung der Gewebsflüssigkeit ist eine wichtige Verbrennungsnoxe. Sie hat die folgenden Veränderungen zur Folge (23). Durch Dampfblasen werden Gewebsstrukturen zerstört, wodurch die räumliche Kompartimentierung verloren geht. Die gelösten Stoffe werden konzentriert und behindern somit die freie Diffusion. Aus dem Verlust der Hydrathülle resultiert eine Änderung der Membranpotentiale und Jonenbeweglichkeit. Schließlich geht die stabilisierende Wirkung der Wasserdipole auf makromolekulare Strukturen verloren und Kondensationsreaktionen werden ermöglicht.

Für das in dieser Arbeit vorliegende Verbrennungsmodell ist von Bedeutung, daß die Verbrennungsnoxe zu einer Nekrose, d.h. zu einem lokalisierten, gleichzeitigen, akuten und begrenzten Zelluntergang führt. Die Wahl der Versuchsbedingungen (250°C, 6o sec) schließt außerdem eine Autolyse des Gewebes wegen der Denaturierung und Inaktivierung der Enzyme aus.

Im Gegensatz zu der Nekrose sterben die Zellen bei der Nekrobiose nacheinander allmählich ab (23).

2.2. Thermischer Zerfall biologischer Verbindungen mit Entstehung flüchtiger Substanzen

In diesem Kapitel wird primär beschrieben, welche flüchtigen Substanzen bei der Pyrolyse organischer Verbindungen entstehen. Die Entstehung fester Rückstände wird nur gestreift.

a) Thermischer Zerfall der Proteine

Hier müssen die Dauer der Hitzeeinwirkung und das unterschiedliche Verhalten einzelner Proteine berücksichtigt werden. Beispielsweise zerfällt Lysozym schon ab 180°C, Casein jedoch erst ab 200 - 250°C (38). Der thermische Zerfall der Proteine wird für die Bereiche unterhalb von 150°C und zwischen 150 und 300°C beschrieben, der Bereich oberhalb von 300°C ist für diese Arbeit nicht von Relevanz.

Unterhalb von 150°C treten folgende Veränderungen auf. Als einzige Aminosäuren werden Lysin, Cystin und Cystein abgebaut. Dabei entstehen als flüchtige Substanzen NH_3 und H_2S (39,40). So verbleiben die Primärstruktur der Proteine und die Aminosäurenzusammensetzung weitgehend erhalten. Jedoch werden die Tertiär- und Quartärstruktur durch Polymerisationsvorgänge (Disulfidbrückenbildung) zerstört (41,40).

Zwischen 150 und 300°C werden die Seitenketten der Aminosäuren abgebaut. So sind bei 250°C alle Aminosäuren von Lysozym, bei 300°C die von Casein zerstört (38). Bedeutend für die Zerstörung der Seitenketten ist die radikalische Spaltung (41). Kato et al. wiesen für diesen Temperaturbereich die Entstehung der unten aufgeführten Substanzen nach (42).

N - haltige flüchtige Substanzen

Äthylamin	Piperiden
Isopropylamin	2-Methyl-Pyrazin
n-Propylamin	2-Äthyl -6- Methyl-Pyrazin
Isobutylamin	Äthylmethyl-Pyridin
n-Butylamin	

S - haltige flüchtige Substanzen

H_2S	Dimethylsulfid
Methyl-Mercaptan	Dimethyldisulfid (+39)

Carbonylverbindungen (180-230°C, ab 250°C weiter abgebaut)

Äthanal	3 - Methylbutanal
Propanal	2 - Methylbutanal
2 Methylpropanal	Benzaldehyd
Butanal	Acetophenone

Alkohole

Propanol	Butanol
2 - Methylpropanol	3 - Methylbutanol

Säuren

Acetat	Isovalerat
Pyruvat	Benzoat
n - Butyrat	

Aus verbranntem Casein wurden die aromatischen Kohlenwasserstoffe Benzol, Toluol und p-Xylol isoliert, deren Ursprung aromatische Aminosäuren sind.

Fujimaki und Mitarbeiter fanden drei organische Säuren in verbranntem Casein: α - Ketoglutarsäure, Weinsäure und Apfelsäure. Mit dem Auftreten dieserSäuren erklärten sie den pH-Abfall in erhitztem Protein zwischen 150 und 230°C (38).

Durch verstärkte Decarboxylierung der Carbonsäuren mit erhöhter CO_2 -Freisetzung ab 200 - 260°C nimmt die Acidose wieder ab (39).

b) Thermischer Zerfall der Kohlenhydrate

Bei Kohlenhydraten setzt der pyrolytische Abbau ab 150 - 160°C unter Gelbfärbung ein, bei höherer Temperatur tritt Dunkelfärbung auf. Es entstehen CO_2, H_2O und organische Abbauprodukte. Dabei dominiert Wasser als Reaktionsprodukt (bei 250°C, 8 h: 20 % H_2O, bei 300°C, 4 h: 40 % H_2O), während flüchtige organische Bruchstücke nur ca. 1 % des Gesamtpyrolysats ausmachen (43,44). Werden verschiedene Kohlenhydrate pyrolysiert, so sind die entstehenden Substanzen identisch, lediglich bezüglich der Quantität ergeben sich Unterschiede (45,46). Dasselbe gilt für die Pyrolysetemperaturen (47,43). Daneben hängt die quantitative Zusammensetzung des Pyrolysats vom Sauerstoffgehalt (45) und allen anderen Reaktionsbedingungen ab. Nach 4-stündigem Erhitzen von Glucose bei 300°C entstehen ein schwarzbraunes Zersetzungsprodukt (47-50%) und flüchtige Substanzen (45-48%) (43). Hier kann ein schwerflüchtiger von einem leichtflüchtigen Anteil unterschieden werden.

Der schwerflüchtige Anteil setzt sich wie folgt zusammen:

1,4 - 3,6 Dianhydroglucopyranose	75 %
1,6 - Anhydroglucopyrose	3 %
5 -Hydroxy-Methyl-Furfural	18 %
Brenzkatechin	3 %
Maltol	2 %

Der leichtflüchtige Anteil besteht größtenteils aus Furanen, gefolgt von Diketonen, Ketonen, Aldehyden und aromatischen Kohlenwasserstoffen.

Eine starke Zunahme der flüchtigen Substanzen tritt erst bei Temperaturen zwischen 500 und 1000°C auf (47).

c) Thermischer Zerfall der Triglyceride

Die thermische Fettzersetzung ist abhängig von Temperatur, Sauerstoffspannung und Sättigungsgrad der im Triglycerid veresterten Fettsäuren (49). Während zum Beispiel ein gesättigtes Triglycerid nichtoxydativ bei 240 - 260°C unter Entstehung freier Fettsäuren zerfällt, ist dieser Prozess unter Sauerstoffanwesenheit bereits bei 190°C abgelaufen (50). Weiterhin werden Triglyceride mit gesättigten Fettsäuren leichter hydrolytisch gespalten als solche mit ungesättigten. Dagegen werden diese bevorzugt oxydativ abgebaut (51). Bei der thermischen Fettzersetzung entstehen die folgenden Substanzen:

1. flüchtige Substanzen
2. nicht flüchtige Monomere, z.B. freie Fettsäuren, Mono- und Diglyceride
3. dimere und polymere Substanzen.

In der flüssen Phase ist eine Polymerisation und damit eine Viskositätszunahme feststellbar (52,53).

Unter oxydativen Bedingungen und hohen Temperaturen entstehen bei der Fettzersetzung die folgenden flüchtigen Substanzen:

Neutrale Substanzen

gesättigte Kohlenwasserstoffe	Alkohole
ungesättigte Kohlenwasserstoffe	Ester
gesättigte Aldehyde	Lactone
ungesättigte Aldehyde	aromatische Verbindungen
Ketone	

Saure Substanzen

gesättigte Säuren	Hydroxysäuren
ungesättigte Säuren	eine aromatische Säure
Ketosäuren	(53).

Unter nichtoxydativen Bedingungen, d.h. Fettzersetzung durch Wärme, entstehen an flüchtigen Substanzen:

freie Fettsäuren	Alkane
Aldehyde	Alkene
Ketone	CO_2, CO (54).

Hierbei bilden die freien Fettsäuren den größten Anteil.

d) Thermischer Zerfall organischer Substanzgemische

Schon beim thermischen Zerfall einzeln vorkommender Substanzklassen entstehen eine sehr große Anzahl von Zersetzungsprodukten. Bei der Pyrolyse organischer Substanzgemische spielen nun die unterschiedlichsten Sekundärreaktionen eine Rolle. Die dabei entstehenden Produktgemische nehmen erheblich an Komplexität zu, und ihre genaue Auftrennung wird um ein Vielfaches erschwert oder teilweise nicht mehr möglich. Die Darstellung dieser Vorgänge würde daher den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Dennoch kann gesagt werden, daß bei der Verbrennung von Haut ähnliche Vorgänge eine Rolle spielen und ähnliche Substanzen entstehen, wie sie in den vorigen Kapiteln beschrieben wurden.

2.3. Mitochondrien - Testsysteme für die Atmungsmessungen

a) Struktur

Mitochondrien sind 2 - 6 µm lange und durchschnittlich o,2 µm dicke Zellorganellen. Mit Ausnahme von Erythrozyten kommen sie in allen Zellen vor: wenige bis über tausend pro Zelle.

Ihre Außenmembran dient als Barriere gegen das externe Milieu, die Innenmenbran ist stark gefaltet. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der äußere Stoffwechselraum, die Innenmembran umschließt die Mitochondrienmatrix, die ca. 3o - 5o nm große Granula enthält. Diese speichern wahrscheinlich Ca^{++}, das zur Regulation des inneren Milieus beiträgt. Beim Crista-Typ ist die Innenmenbran quer zur Längsachse gefaltet, beim seltener vorkommenden Tubulus-Typ orientieren sich die fingerförmigen Ausstülpungen in Längsrichtung.

In der Innenmenbran sitzen die Enzyme für die Atmungskette und die ATP-Synthese, in der Matrix sind die Enzyme für Citratzyklus, Protein- und Lipidsynthese lokalisiert.

Schatz schlüsselt die Struktur der Innenmenbran weiter auf (55). Danach ist die Innenmembran im Gegensatz zur Außenmembran von dicht und regelmäßig angeordneten Kügelchen ("knobs") mit ungefähr 8 - 9 nm Durchmesser besetzt. Diese sind durch zylindrische Stiele ("stalks") mit dem Membrankontinuum verbunden, das seinerseits wieder aus globulären Basiseinheiten von ca. 9 nm Durchmesser aufgebaut ist.

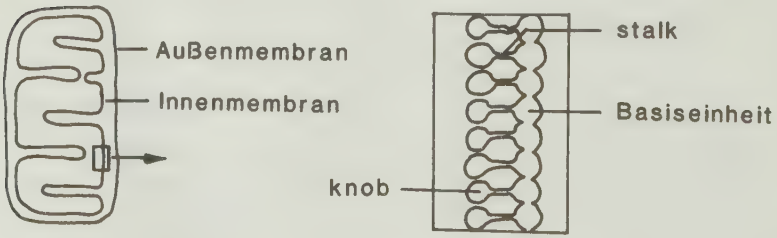

Abb. 1: Mitochondrium vom Crista-Typ
Ausschnitt: Struktur der Innenmembran

Penner et al. (Überlegungen zur "Endosymbiontentheorie") als mitochondriale ATPase, eine Beteiligung am Elektronentransport konnte ausgeschlossen werden. Wo und in welcher Weise die Information in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, kann jedoch bis heute noch nicht beantwortet werden.

Mitochondrien besitzen als eigenes Genmaterial eine ringförmige DNS und etwa 12 nm große RNS-Granula. Somit können Mitochondrien Proteine synthetisieren und sich selber durch Teilung vermehren. Sie sind als einzige aus Zytomembranen aufgebauten Zellorganellen Matrixgetrieben, aber dennoch in gewissem Umfang vom Zellkern abhängig. Es wird diskutiert, daß Mitchondrien aus Bakterien entstanden sind (56).

b) Stoffwechselleistungen

Man kann vier Stoffwechselaktivitäten von Mitochondrien unterscheiden (57).

Hauptaufgabe und für den Metabolismus am bedeutendsten ist die oxidative Phosphorylierung. Man versteht darunter die Bildung von ADP aus AMP und Orthophosphat bzw. von ATP aus ADP und Orthophosphat, wenn diese Esterbildungen durch die mit dem Elektronentransport gekoppelte Synthese von primären energiereichen Verbindungen verbunden sind. Dabei werden beim Transport eines Elektronenpaares über die Atmungskette drei Moleküle ATP gebildet.
Die Gleichung hierfür lautet:

$$NADH + H^+ + 3\ ADP + 3\ P + \frac{1}{2}\ O_2 \rightarrow NAD^+ + 3\ ATP + 4\ H_2O$$

(38,59).

Bei der Oxidation von einem Mol $NADH_2$ durch O_2 werden 52 kcal freigesetzt, von denen 30,1 kcal in Wärme überführt werden. 21,9 kcal erfordert die Synthese von 3 Mol ATP. Das entspricht einer Speicherung von 42 % der Gesamtenergie in Form energiereicher Phosphate. Für eine diffe-

renziertere Betrachtung wird auf die Literatur verwiesen. Ferner sind Mitochondrien zum Jonentransport befähigt. Kationen werden unter Energieverbrauch, Anionen durch passive Penetration transportiert. Die Translokationsgeschwindigkeit der Kationen läßt sich durch Adsorption an Acetat erhöhen.

Die dritte Stoffwechselaktivität der Mitochondrien besteht in dem umgekehrten Elektronenfluß, wobei die aus Bernsteinsäure oder reduziertem Cytochrom C stammenden Elektronen unter Energieverbrauch NAD^+ zu NADH reduzieren vermögen.

Als vierte Stoffwechselaktivität kann der energieabhängige Protonentransport genannt werden.

c) Hemmstoffe der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung und Entkoppler

Auf Grund ihres Angriffortes in der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung lassen sich Hemmstoffe der Atmungskette, Hemmstoffe der oxydativen Phosphorylierung und Entkoppler unterscheiden. Dazu wird kurz der P:O Quotient definiert. Er gibt das Verhältnis von gebildetem ATP zu verbrauchtem Sauerstoff an und beträgt bei Substanzen, die durch NAD dehydriert werden, 3.

Die Reaktionen der Atmungskette und oxydativen Phosphorylierung können vereinfacht folgendermaßen formuliert werden:

$$AH_2 + B + C \rightleftharpoons A \quad C + BH_2 \qquad (1)$$

$$A \quad C + ADP + P \rightleftharpoons A + C + ATP + H_2O \qquad (2)$$

Die Hemmstoffe der Atmungskette inhibieren Reaktion (1), während die Hemmstoffe der oxydativen Phosphorylierung Reaktion (2) inhibieren. Es resultiert eine Atemdepression, der P:O Quotient bleibt dagegen erhalten.

Entkoppler erlauben die Oxidation von AH_2 durch B:

$$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2.$$

Die Bildung von ATP ist jedoch blockiert, obwohl der Sauerstoffverbrauch leicht erhöht sein kann. Der P:O Quotient sinkt damit unter 3.

Hemmstoffe der Atmungskette

HCN	Rotenon
Antimycin	Malonat
Amytal	Arsen

Hemmstoffe der oxydativen Phosphorylierung

Oligomycin	Synthalin
Amytal	Atractylosid
Phenyläthylbiguanid	

Entkoppler

2,4 - Dinitrophenol	Dicumarol	
2,6 - Dinitrophenol	Arsen	(60).

Für die vorliegende Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, ob die bei der Verbrennung entstandenen toxischen Substanzen die Atmungsaktivität im Sinne einer Hemmung oder Entkopplung beeinflussen.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Gewinnung der trockenen Destillate

20 weibliche NMRI-Mäuse (Versuchstierzuchtanstalt W.Gassner 8741 Sulzfeld) wurden durch Genickbruch getötet. Nach gründlicher Rasur der Fellhaare wurde die Haut in toto abpräpariert und vom subcutanen Fettgewebe befreit. Die so gewonnenen Mäusehäute wurden unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerrieben. Für die Verbrennung wurden die zermörserten Häute in zwei Quarzschiffchen gegeben. Diese schob man in ein Quarzrohr, das von einem Heizmantel umgeben war. Durch ihn konnten Temperaturen zwischen 20 und 1000°C erzeugt werden.

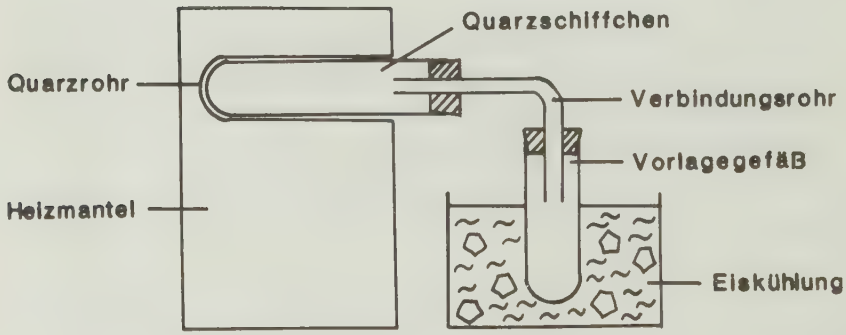

Abb. 2: Geräteanordnung zur Herstellung der trockenen Destillate

Nun wurden die Temperaturen kontinuierlich von 20 auf 250°C erhöht. Die dabei entstandenen flüchtigen Substanzen gelangten durch ein Verbindungsrohr in eisgekühlte Vorlagegefäße, wo sie sofort kondensierten (Kühlfalle).

Es wurden 3 Fraktionen aufgefangen, so daß die Vorlagegefäße bei 140 und 200°C gewechselt wurden. Von 20 bis 140°C erschien die transparente Fraktion 1, von 140 bis 200°C die gelbliche Fraktion 2 und von 200 - 250°C die übel riechende braune Fraktion 3.

Die Destillate wurden bis zur Verwendung bei den Atmungsmessungen in gut verschlossenen Eppendorfhütchen bei 2°C aufbewahrt.

3.2. Operations- und in-Vivo-Verbrennungstechnik

Für die Versuche, bei denen die Rückenhaut der Ratten in Narkose verbrannt wurden, wurden männliche Tiere mit einem Gewicht zwischen 450 und 550 g ausgesucht. Während einer Äthernarkose wurde intraperitoneal Nembutal injiziert und zwar 6 mg (≙ 0,1 ml) / 100 g Körpergewicht. Da die Versuchstiere anfangs bei dieser Dosierung starben, wurde das Nembutal 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Somit wurde eine zu rasche Resorption verhindert und die Narkose hielt 2 - 3 Stunden an. Die narkotisierte Ratte wurde gewogen und ihre Rückenhaut sauber rasiert. Dazu wurde sie in Bauchlage an den Extremitäten fixiert. Nach Anbringen zweier ca. 4 cm langer Schnitte an der Rückenhaut direkt distal des Halses und proximal des Schwanzes wurde die dazwischen liegende Cutis vom darunterliegenden Bindegewebe abpräpariert.

Wärmemessungen an einem Verbrennungsmodell der Maus mit 250°C zeigten, daß auf der Muskelfaszie des Rückens der Tiere Temperaturen von 70 - 80°C entstanden (37).

Um bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verbrennungen solche Wärmeabströmungen auf tiefergelegene Gewebs-

schichten zu vermeiden, wurde unter der freipräparierten Cutis ein Pyrexglasspatel mit folgendem Querschnitt durchgeschoben:

Dieser ragte jeweils ca. 3 cm über Kopf- und Schwanzende hinaus und wurde samt Versuchstier angehoben und in zwei Stationsklemmen eingespannt. Während der Verbrennung wurde durch den Kanal von einem Fön kalte Luft geblasen.

Von der freipräparierten Cutis wurden sechs nebeneinanderliegende gleich große Flächenstücke verbrannt. Dazu wurde ein auf 250°C erhitzter Kupferstempel mit einer Fläche von 4 x 5 cm mit kräftigem Druck auf das jeweilige Hautstück aufgesetzt. Der Kupferstempel war mit einem elektrischen Heizgerät mit Temperaturregler verbunden, das ihn auf die konstante Temperatur von 250°C erhitzte. Somit ergab sich unter Berücksichtigung der Schrumpfung des verbrannten Gewebes eine Gesamtverbrennungsfläche von ca. 90 cm^2 , was einem Anteil an der Gesamtkörperoberfläche von ca. 20-30 % entspricht.
Danach wurde der Spatel unter weitergeführter Luftkühlung langsam entfernt. Jetzt wurden die Schnitte vernäht und zur Schockprophylaxe 20 ml Ringerlösung i.p. injiziert. Zum Schluß wurde das Versuchstier im Käfig auf einen ca. 50°C warmen Heizkörper gesetzt und nach 3 Stunden in den Tierstall gebracht. Bis 24 Stunden vor der Aufarbeitung für die Atmungsmessungen erhielten die so operierten Tiere Altrominfutter ad libitum; zu trinken Wasser bis zur Aufarbeitung.

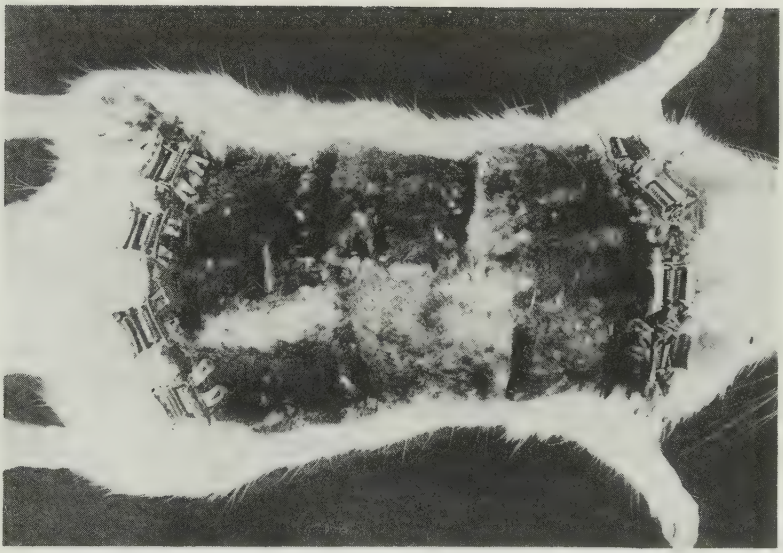

Abb. 3: Ratte nach Verbrennung von ca. 90 cm^2 der Rückenhaut

3.3. Kreuztransplantationen (Cross-Grafting)

Bei den Kreuztransplantationen wurde das erste Versuchstier bis einschließlich der Hautschnitte unterhalb des Halses und oberhalb des Schwanzes, wie bei "Operations- und in -vivo - Verbrennungstechnik" beschrieben, vorbereitet.

Das zweite Versuchstier wurde bis zur Entfernung des Kühl-

spatels nach der o.g. Technik vorbereitet.
Darauf wurden bei beiden Tieren die noch mit der Resthaut verbundenen freipräparierten Hautstücke durch zwei laterale Schnitte vollends abgetrennt. Das ca. 90 cm^2 große verbrannte Hautstück wurde dem unverbrannten Tier, das ebenso große unverbrannte Hautstück dem verbrannten Tier transplantiert. Anschließend wurden die Hautstücke vernäht und beide Tiere nach dem oben beschriebenen Procedere bis zur Aufarbeitung weiterbehandelt.

3.4. Isolierung der Mitochondrien

Vorbereitung:

Herstellung von 1 l Isolationsmedium:

0,25 M Saccharose
1 mM EDTA - Na_2
10 mM Tris - HCl

Die genannten Substanzen wurden mit Aqua bidestillata auf 1 l aufgefüllt, mit 3 n KOH auf pH 7,2 titriert und bei 2^oC aufbewahrt.

Durchführung:

Die Ratte wurde mit Äther narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Dann wurden Bauchsitus und Thorax eröffnet, die Aorta und der Truncus pulmonalis durchtrennt und die Ratte so gut entblutet. Nach Durchtrennen der Vena cava inferior und Vena portae wurde die Leber entnommen, sauber vom Bindegewebe befreit und zweimal im jetzt eisgekühlten Isolationsmedium gewaschen. Sodann wurde die Leber in 30 ml Isolationsmedium fein zerschnitten und unter Eiskühlung homogenisiert (Potter mit weitgängigem Teflonpistill, 6o rpm, 2 Durchgänge). Das Homogenat wurde durch ein grobmaschiges Nylonnetz gefiltert, auf 2 Zentrifugengläser verteilt und dann 1o min bei 12OO rpm und 0-2^o C zentrifugiert (Beckmann J - 6, Ausschwingrotor JS - 4.2). Nach sorgfältigem Entfernen der oben schwimmenden Fettschicht wurde der Überstand in

ein vorgekühltes Zentrifugenglas entleert und 10 min bei 4300 rpm und 0-2°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Mitochondrienpellet noch dreimal unter den gleichen Bedingungen mit Isolationsmedium gewaschen und bei 4300 rpm zentrifugiert. Schließlich wurden die Mitochondrien in 1-1,5 ml Isolationsmedium suspendiert und auf Eis gestellt. Zu den direkt im Anschluß durchgeführten Atmungsmessungen wurden jeweils 5o µl Mitochondriensuspension verwendet.

3.5. Aufbau und Funktion der modifizierten Sauerstoffelektrode vom Typ Clark

Delieu und Walker entwickelten die Elektrode vom Typ Clark 1972. Die polarographische Meßmethode ist in (61) beschrieben. Für die Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien wurde die von der Firma Bachofer Reutlingen modifizierte Elektrode verwendet (62, siehe Abb.4).

Die Platinkathode in der Mitte des Meßfühlers (Elektrodenscheibe) ist mit einem dünnen Blatt Papier und einer Teflonmembran bedeckt. Der Durchmesser der Kathode beträgt 2 mm, der Meßstrom liegt in der Größenordnung 1 µA. Rings um die Kathode befindet sich in einer Vertiefung der Scheibe die Anode aus Silber; als Elektrolyt dient KCl. Die Elektrodenscheibe wird wie aus Abb. 4 ersichtlich von unten in den Außenzylinder aus Acrylglas eingesetzt, so daß sich die erhabene Mitte der Elektrodenscheibe in dem Reaktionsgefäß aus Borosilikatglas befindet. Ein genau passender Kolben wird in den oberen Teil des Reaktionsgefäßes eingeschoben. Durch Einstellen der Tauchtiefe kann das Volumen im Reaktionsgefäß zwischen o,5 und 2,0 ml auch während der Reaktion variiert werden. Die Probenzugabe erfolgt durch die sich im Kolben befindliche Kapillare mittels einer Mikroliterspritze. Zwischen dem Außenzylinder aus Acrylglas und dem Reaktionsgefäß befindet sich ein Wassermantel, der durch zwei einander gegenüberliegende

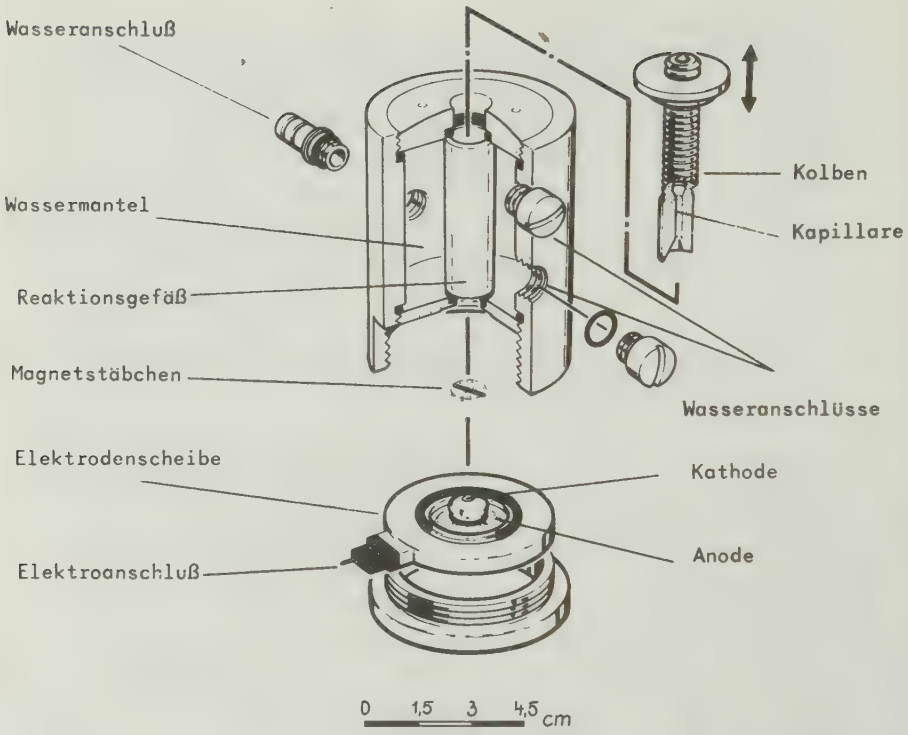

Abb. 4: Sauerstoffelektrode vom Typ Clark modifiziert nach Bachofer

Anschlußöffnungen an einen externen, temperaturkontrollierten Wasserkreislauf angeschlossen werden kann. Bei den Atmungsmessungen an Mitochondrien wurde der Wasserkreislauf von ei-

nem Wasserbad gespeist, das auf konstant 25°C temperiert war und in dem sich auch die ins Reaktionsgefäß zu gebenden Lösungen und Reagentien befanden. Die bis jetzt beschriebene Meßeinheit wird in toto auf einen Magnetrührer aufgesetzt. Seine Rotationsgeschwindigkeit kann stufenlos eingestellt werden. Unmittelbar oberhalb der Platinelektrode im Reaktionsgefäß dreht sich somit das Magnetrührstäbchen.

Über einen Miniaturstecker an der Elektrodenscheibe wird die Meßzelle mit dem Input des Spannungsgebers (1 mV; $\frac{1}{10}$ mV) elektrisch verbunden. Der Steckdosenauslaß zum Schreiber erfolgt am Spannungsgeber über 4 mm-Buchsen mit Klemmvorrichtung.

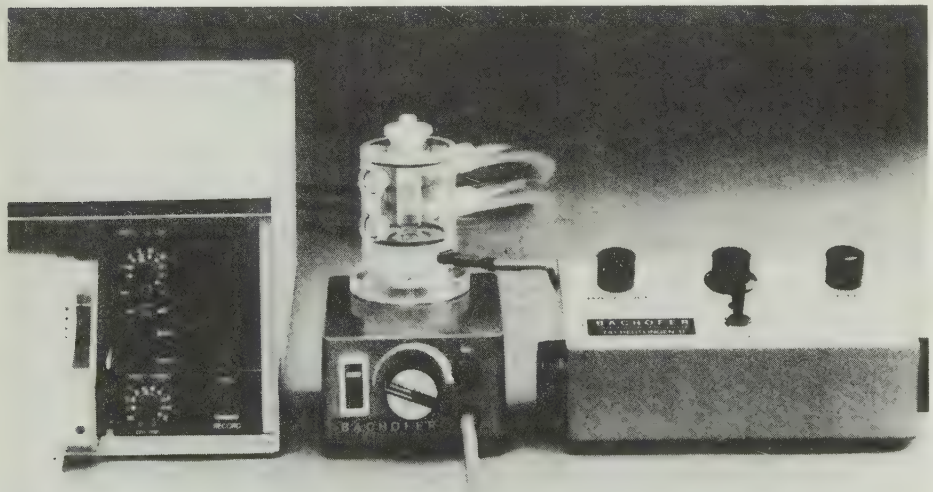

Abb. 5: Schreiber, Sauerstoffelektrode mit Magnetrührer, Spannungsversorgung mit Nullpunktunterdrückung

3.6. Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien

Vorbereitung

Herstellung von 1 l Basismedium

0,15 M KCl
6 mM $MgCl_2$
10 mM Tris-HCl
1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat - Puffer 1/15 molar.

Die genannten Substanzen wurden mit Aqua bidestillata auf 1 l aufgefüllt, mit 3 n KOH auf pH 7,20 titriert und bei 2^oC aufbewahrt.

200 mmolare Succinatlösung
25 mmolare ADP - Na_2-Lösung.

Durchführung

Die Atmungsmessungen wurden mittels der von der Firma Bachofer Reutlingen modifizierten Clark-Elektrode durchgeführt (62).
Das Basismedium wurde mit Sauerstoff durchperlt und so abgesättigt. Es enthielt dann 258 nM O_2/ml. Die Eichung des Schreibers erfolgte mit dem gesättigten Basismedium, das dem 100 % - Bereich entsprach. Der 0% - Bereich stellte sich nach Zugabe von Natriumthiosulfat ein, da durch die Reaktion

$$Na_2S_2O_4 + O_2 + H_2O \longrightarrow NaHSO_4 + NaHSO_3$$

sämtlicher O_2 im Reaktionsgefäß verbraucht wurde (Abb.6). Pro Messung wurde 1 ml Basismedium in das auf 25^oC thermostatierte Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 50 µl Mitochondriensuspension hinzugefügt.

Status 4 Atmung stellte sich nach Zugabe von 10 µl Succinatlösung (200 mmolar) ein. Durch Zugabe von 5 ul ADP-Na_2 (25 mmolar) wurde die Atmung in Status 3 überführt. Die Zugabe der die Atmung beeinflussenden Substanzen erfolgte entweder nach der Mitochondrien-, der Succinat- oder der ADP-Na_2- Zugabe.

Am Ende jeder Messung wurde 1 ml des Reaktionsgemisches entnommen und bis zur später erfolgenden Proteinbestimmung tiefgefroren aufbewahrt.

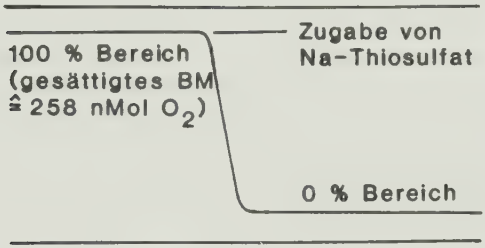

Abb. 6: Eichung des Schreibers

3.7. Proteinbestimmung

Es wurde die Methode von Lowry (63) modifiziert nach (64) verwendet. Bestimmt wurden die nach jeder Atmungsmessung aus der Clark-Elektrode abpipettierten Mitochondrienaliquote, die in Eppendorfhütchen tiefgefroren aufbewahrt wurden.

Vorbereitung: Lösungen

1. o,3 n NaOH - Lösung
2. 100 ml 1%-ige Citratlösung
3. o,5 g $CuSO_4$ 5 H_2O in 100 ml 1%-iger Citratlösung auflösen
4. 1000 ml 2 %-ige Na_2CO_3-Lösung

5. Kupferreagenz: 20 ml Lösung 3 und 1000 ml Lösung 4 gut mischen
6. Folin-Reagenz: 1 Teil Folin-Ciocalteus Phenolreagenz von Merck + 2 Teile Aqua destillata

Durchführung

Jeweils 1 ml der Probe wurde mit o,5 ml der o,3 n NaOH versetzt, gut durchgemischt und im Wasserbad 90 min bei 60°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 5 ml Kupferreagenz unter ständigem Schütteln wurde die Lösung 10 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Sodann wurde o,5 ml Folinreagenz zugesetzt, wieder gut gemischt und nach 3o min Aufbewahrung im Dunkeln bei einer Wellenlänge von 578 nm gegen den weiter unten charakterisierten Leerwert die Extinktion gemessen.

Leerwert: Ansatz wie oben, aber H_2O statt Protein. Bei der Bestimmung wurde eine Eichverdünnungsreihe mitgeführt, die aus 7 Verdünnungen von 92%-igem Rinderserumalbumin in Aqua destillata bestand.

Die zu bestimmenden Proben wurden so verdünnt, daß sie in den Extinktionsbereich E = o,1 bis E = o,3 fielen.
Die Berechnung des Verbrauchs an nM O_2/mg Protein/min geschah wie folgt. Aus den Atmungskurven wurde der Verbrauch an nM O_2/min abgelesen und mittels der aus der Proteinbestimmung erhaltenen Konzentration der jeweiligen Mitochondrienaliquote auf 1 mg Protein umgerechnet.

mg Protein	200	150	100	50	25	12,5	6,25
E	0,296	0,230	0,155	0,079	0,038	0,017	0,007

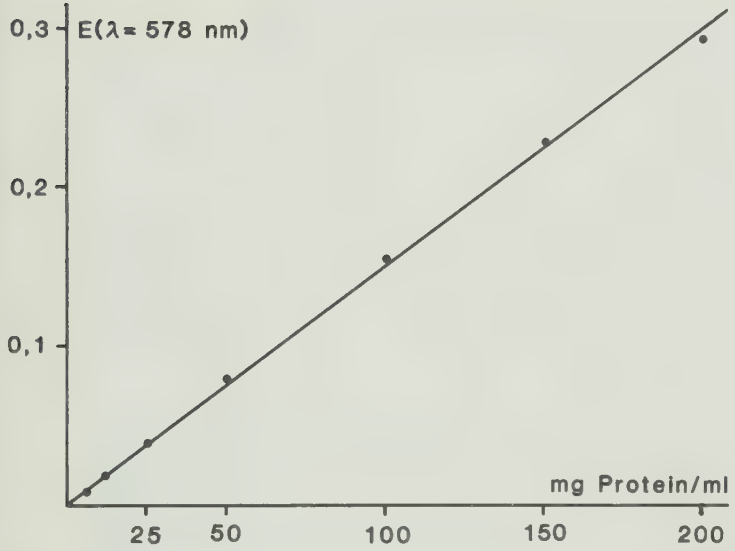

Abb. 7: Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Lowry

4. E R G E B N I S S E

4.1. Atmungsmessungen an Mitochondrien nicht vorbehandelter Ratten

a) Direktinkubation mit trockenen Destillaten

Es wurden nicht vorbhandelte Ratten mit 450 - 550 g verwendet. Leberentnahme, Isolierung der Mitochondrien mit Atmungsmessungen sind unter 3.4. und 3.6. beschrieben. Nach Zugabe von 50 µl Mitochondriensuspension in das Reaktionsgefäß der Sauerstoffelektrode (siehe 3.5.) wurde zwischen 1 1/2 und 3 min gewartet, um so eine exakte Einstellung der Basisatmung der Mitochondrien zu gewährleisten. Sodann wurden die Fraktionen 1-3 der trockenen Destillate (siehe 3.1.) in Konzentrationen von 10 µl, 5 µl und 2 µl zugefügt.

In Abb. 8 sind die bei diesen Messungen erhaltenen Atmungskontrollkoeffizienten (ACR) graphisch dargestellt. Die dazugehörigen Zahlenwerte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es zeigt sich, daß alle 3 Fraktionen der trockenen Destillate zu einer deutlichen Reduktion der Atmungskontrollkoeffizienten führten. Bei Fraktion 1 und 3 nahm jedoch diese Reduktion mit abnehmender Konzentration - 10, 5 bzw. 2 µl Destillat pro ml Reaktionslösung - ab, während sie bei Fraktion 2 voll erhalten blieb.

Auffällig war, daß ca. 7 Tage nach Herstellung die Wirksamkeit der Fraktion 1 stark, die von Fraktion 2 weniger stark nachließ, obwohl alle trockenen Destillate gut verschlossen bei 2°C aufbewahrt wurden. Bei den Atmungsmessungen ergaben sich dann folgende ACR-Werte für Fraktion 1: 10 µl: 3,35; 20 µl: 3,32; 50 µl : 2,36, für Fraktion 2: 10 µl: 1,14; 5 µl: 1,52; 2 µl : 2,29.
Mit diesem schon geringfügig vor dem siebten Tag nach Herstellung der trockenen Destillate auftretenden Effekt

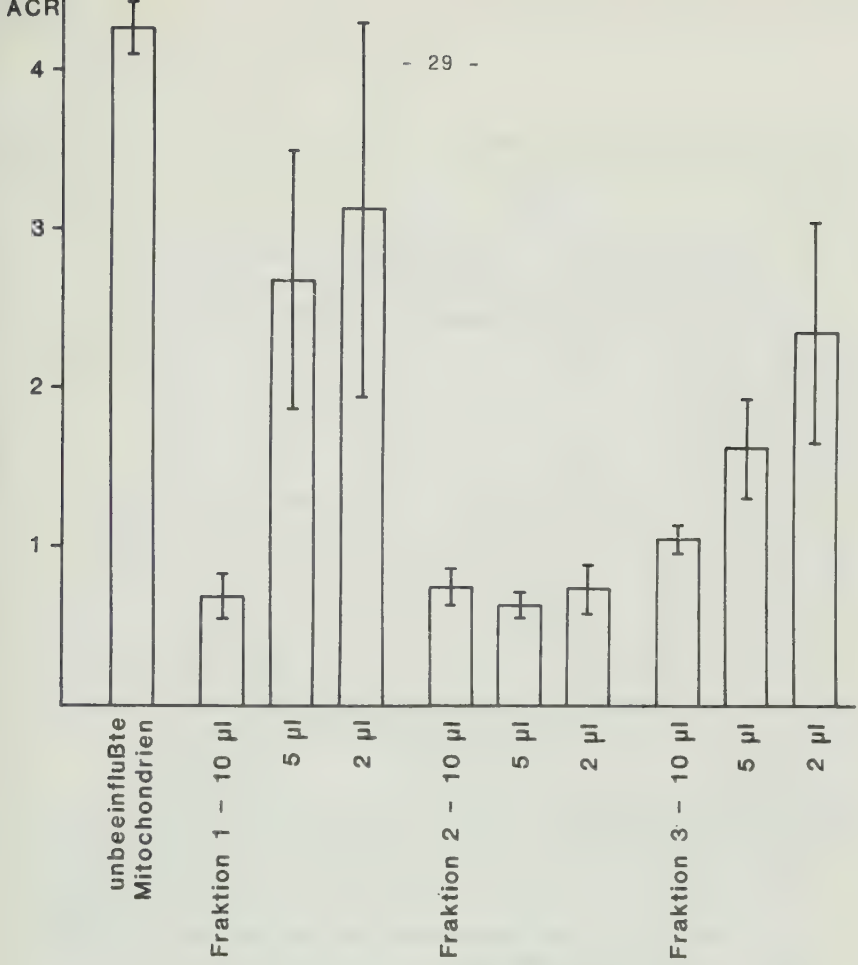

Abb. 8: ACR bei Mitochondrien unbehandelter Tiere und nach Zugabe der Fraktionen 1–3 trockener Destillate

	10 µl	5 µl	2 µl
Fraktion 1	0,68 ± 0,14	2,68 ± 0,82	3,14 ± 1,18
Fraktion 2	0,75 ± 0,12	0,64 ± 0,08	0,74 ± 0,16
Fraktion 3	1,06 ± 0,09	1,64 ± 0,32	2,37 ± 0,69
Kontrolle = unbeeinflußte Mitochondrien : ACR = 4,27 ± 0,17			

Tab. 1: zugehörige Zahlenwerte zu Abb. 8

lassen sich auch die großen Standardabweichungen der ACR-Werte bei Fraktion 1 erklären.

Die Reihenfolge in der Destillatzugabe wurde dann zweimal variiert. Veränderung 1 bestand darin, daß jeweils 10 µl der trockenen Destillate erst nach Mitochondrien - und Succinatzugabe ins Reaktionsgefäß zugefügt wurden. Es ergaben sich die folgenden Mittelwerte für die Atmungskontrollkoeffizienten:
10 µl Fraktion 1: 0,38; 10 µl Fraktion 2: 1,17; 10 µl Fraktion 3: 2,55.

Bei Veränderung 2 wurden jeweils 10 µl der trockenen Destillate nach Mitochondrien-, Succinat- und ADP-Zugabe hinzugefügt. Es resultierten folgende Atmungskontrollkoeffizienten:
10 µl Fraktion 1: 1,24; 10 µl Fraktion 2: 1,71; 10 µl Fraktion 3: 3,16.

In Abb. 9 sind die Mittelwerte der drei verschiedenen Versuchsreihenfolgen graphisch dargestellt.

Auffallend ist, daß die Reduktion der Atmungskontrollkoeffizienten abnahm, je später im Versuchsablauf die Destillatzugabe erfolgte, jedoch war sie im Vergleich zur ursprünglichen Versuchsreihenfolge nicht erheblich erniedrigt.

Schließlich seien noch die Atmungskurven bei den verschiedenen Versuchsreihenfolgen beschrieben.

Bei Mitochondrien nicht vorbehandelter Tiere (siehe Abb.10) wurde die Basisatmung durch Succinatzugabe in die 3-4fach gesteigerte Status 4 Atmung überführt. Diese ist ebenfalls ein Parameter für die Basisatmung der Mitochondrien, nur ist sie wegen der Succinatzugabe (Metabolit des Citratzyklus) um einen Faktor 3 - 4 erhöht. Durch Zugabe von ADP erhielt man eine weitere Atemsteigerung: Status 3 Atmung. Die gefundenen Atmungskontrollkoeffizienten lagen zwischen 4,07 und 4,58.

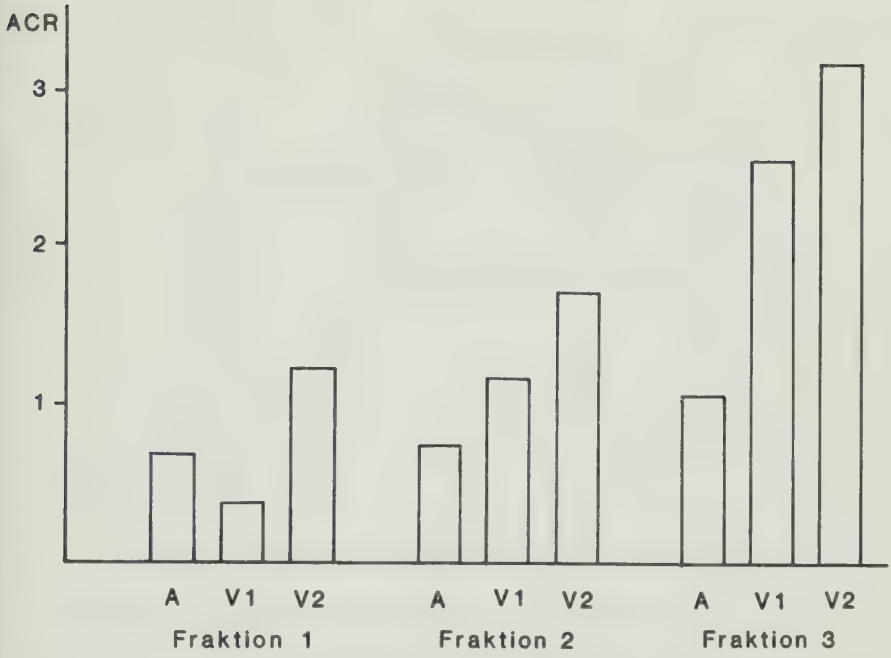

Abb. 9: ACR bei verschiedenen Reihenfolgen der Zugabe von jeweils 10 ul Destillat

Legende: A: ursprüngliche Versuchsreihenfolge
V1: Variation 1 der Versuchsreihenfolge
V2: Variation 2 der Versuchsreihenfolge

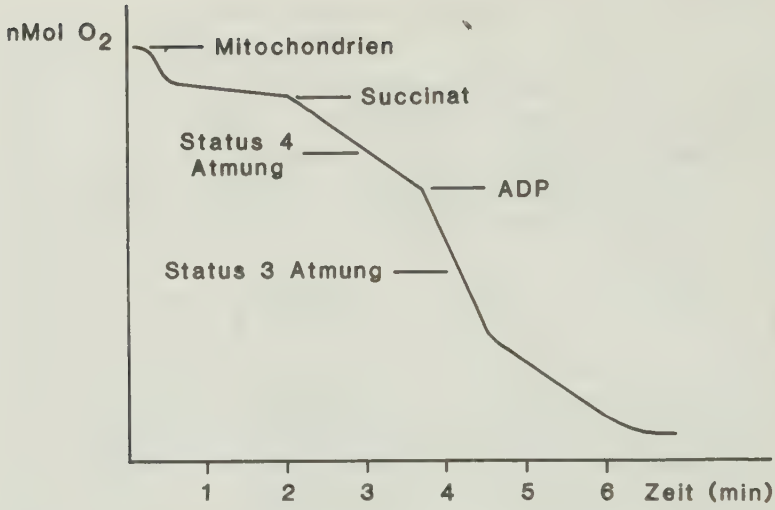

Abb. 10: Atmungskurve unbeeinflußter Mitochondrien

Ermittlung des Atmungskontrollkoeffizienten (ACR):

$$ACR = \frac{\text{Atmungsrate in Status 3}}{\text{Atmungsrate in Status 4}}$$

Die Abb. 11 - 13 zeigen die Atmungskurven, die man nach Destillatzugabe zu verschiedenen Zeitpunkten während des Versuchsablaufs erhielt. Alle 3 Fraktionen bewirkten prinzipiell gleiche Atmungskurvenverläufe.

Die Abb. 11 a,b; 12 a,b; 13 a,b lassen erkennen, daß bei Zusatz von Destillat eine Abschwächung oder nur eine geringfügige Steigerung der Succinatatmung durch ADP-Zugabe

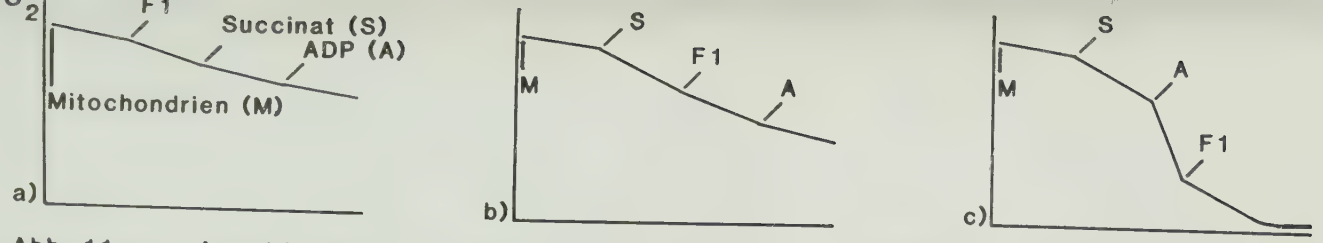

Abb. 11 a-c: Auswirkungen von Fraktion 1 (F1) der trockenen Destillate auf die Mitochondrienatmung

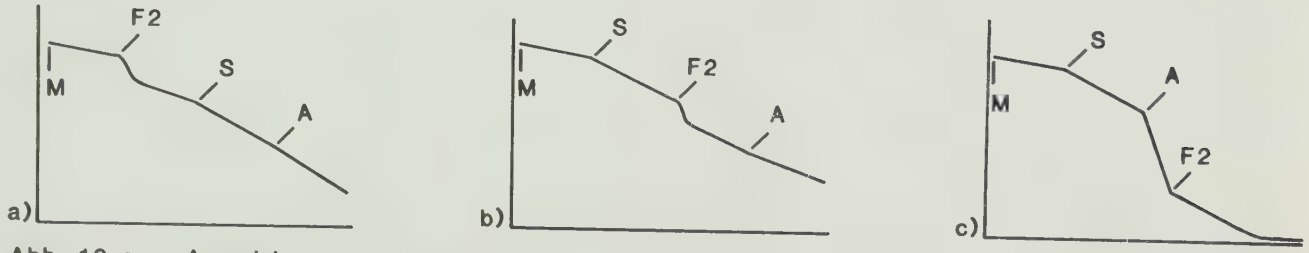

Abb. 12 a-c: Auswirkungen von Fraktion 2 (F2) der trockenen Destillate auf die Mitochondrienatmung

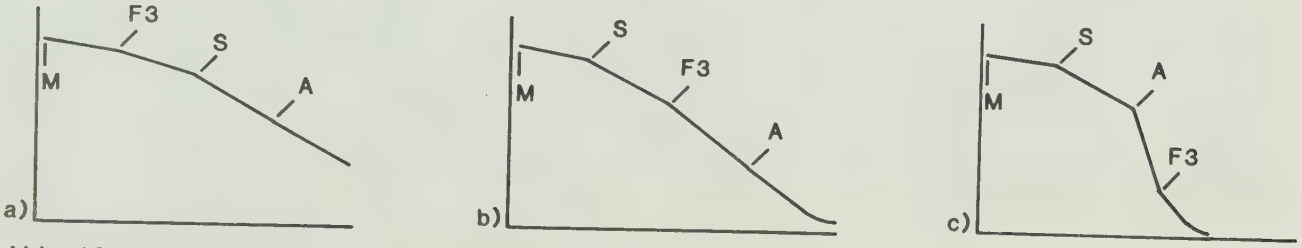

Abb. 13 a-c: Auswirkungen von Fraktion 3 (F3) der trockenen Destillate auf die Mitochondrienatmung

erreicht wurde. Fügte man Destillat erst nach ADP-Zugabe den atmenden Mitochondrien zu (Abb. 11 c, 12 c, 13 c), so wurde die Status 3 Atmung annähernd auf den Wert der Status 4 Atmung reduziert.

Dem Atmungsverlauf in Abb. 11 a ist noch ein weiterer Befund zu entnehmen. Wurden 10 µl Fraktion 1 direkt nach der Mitochondrienzugabe ins Reaktionsmedium zugefügt, so ergab sich im Vergleich zu Versuchsreihenfolge V1 und V2 (siehe oben) eine geringfügige Reduktion der Succinatatmung.

Nach Zugabe von Fraktion 2 kam es zu einer kurzfristigen Erhöhung der Atmung. Diese wurde aber sehr bald wieder auf den Wert der davor bestehenden Atmungsrate zurückgeführt.

b) Direktinkubation mit definierten Substanzen

Aus bei 250°C verbrannter Mäusehaut wurden gaschromatographisch die folgenden flüchtigen Substanzen identifiziert: Kohlenmonoxid, Kohlendioxid, Trimethylamin, Carbondisulfid (Schwefelkohlenstoff), Methyläthylketon und Pyrrol (25).

Mit Ausnahme von CO und CO_2 wurden die atmenden Mitochondrien mit diesen definierten Substanzen inkubiert. Die Zugabe erfolgte in der Reihenfolge: Mitochondrien - definierte Substanzen - Succinat - ADP. Es ergaben sich die in Tabelle 2 aufgeführten Mittelwerte der Atmungskontrollkoeffizienten.

Nach Inkubation mit Trimethylamin wurden im Reaktionsgemisch folgende pH-Werte gemessen: 10 µl: pH = 9,70; 1 µl: pH = 8,11. In einer Kontrollmessung wurden daraufhin den atmenden Mitochondrien 1,16 µl gesättigte KOH zugesetzt. Der pH betrug dann 9,60 und es resultierte ein Atmungskontrollkoeffizient von 0,29. In einer weiteren Messung wurden dann 10 µl auf pH 7,4 titriertes Trimethyl-

	10 µl	5 µl	2 µl	1 µl	0,5 µl
Trimethylamin	0,71			1,91	3,29
Carbondisulfid	0,90	2,21	3,29		
Methyläthylketon	2,91	3,88			
Pyrrol	1,08	2,33	3,12		

Tab. 2: Atmungskontrollkoeffizienten bei Direktinkubation mit definierten Substanzen

amin zugesetzt. Der ACR betrug dann 3,13. Es läßt sich feststellen, daß der alkalische pH bei Zugabe von Trimethylamin bei der Erniedrigung des ACR eine Rolle spielte und daß titriertes Trimethylamin (Salzform) fast wirkungslos war. Ein den ACR reduzierender Effekt von Trimethylamin läßt sich aber nicht ausschließen.

Carbondisulfid und Pyrrol bewirkten beide eine deutliche, Methyläthylketon eine noch immer erkennbare Erniedrigung des ACR.

Analog dem Atmungskurvenverlauf in Abb. 11 a konnte nach Zufügen der definierten Substanzen ins Reaktionsgefäß direkt nach Mitochondrienzugabe keine eindeutige Reduktion der Succinatatmung festgestellt werden.

4.2. Atmungsmessungen an Mitochondrien vorbehandelter Ratten mit statistischer Auswertung

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte in zwei Abschnitten.

In Abschnitt 1 wurden die Rückenhäute von 450 - 550 g schweren Ratten, wie unter 3.2. genau beschrieben, verbrannt. Es wurden 3 Versuchsgruppen gebildet. Bei Gruppe 1 erfolgte die Isolierung der Lebermitochondrien (siehe 3.4.) einen Tag, bei Gruppe 2 zwei Tage und bei Gruppe 3 fünf Tage nach der Verbrennung. Bei den dann durchgeführten Atmungsmessungen wurden die Status 4 und die Status 3 Atmung bestimmt, wobei keine die Atmung beeinflussenden Substanzen zugesetzt wurden.

Abschnitt 2 bestand in der Durchführung der Kreuztransplantationen (siehe 3.3.). Die Isolierung der Mitochondrien von den jeweiligen Transplantationspaaren erfolgte zwei Tage post operationem. Was die Atmungsmessungen anbelangt, so wurden die isolierten Mitochondrien wie die in Abschnitt 1 isolierten behandelt.

Abb. 14 zeigt die Atmungsraten der Status 4 Atmung nach Succinatzugabe bei vorbehandelten Tieren.

In Tab.3 sind die dazugehörigen Zahlenwerte angegeben.

In Abb. 15 sind die Atmungskontrollkoeffizienten der vorbehandelten Tiere wiedergegeben.

Tab. 4 enthält die dazugehörigen Zahlenwerte.

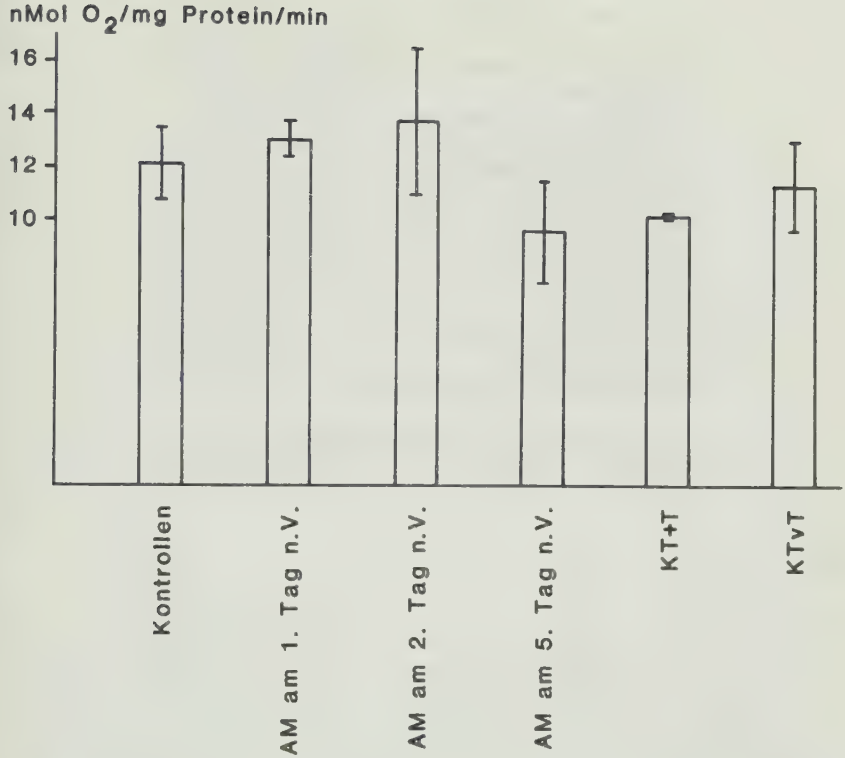

Abb. 14: Verbrauch an nMol O_2/mg Protein/min bei Succinatatmung von Mitochondrien vorbehandelter Ratten (n = 4-6)

Legende: AM: Atmungsmessungen
n.V.: nach Verbrennung
KT+T: kreuztransplantierte Tiere mit unverbranntem Transplantat
KTvT: kreuztransplantierte Tiere mit verbranntem Transplantat

(siehe auch Abkürzungsverzeichnis)

	Succinatatmung
Kontrolle	12,10 ± 1,37
AM am 1. Tag n.V.	13,08 ± 0,69
AM am 2. Tag n.V.	13,80 ± 2,77
AM am 5. Tag n.V.	9,65 ± 1,95
KT+T	10,21 ± 0,08
KTvT	11,43 ± 1,68

Tab. 3: zugehörige Zahlenwerte zu Abb. 14

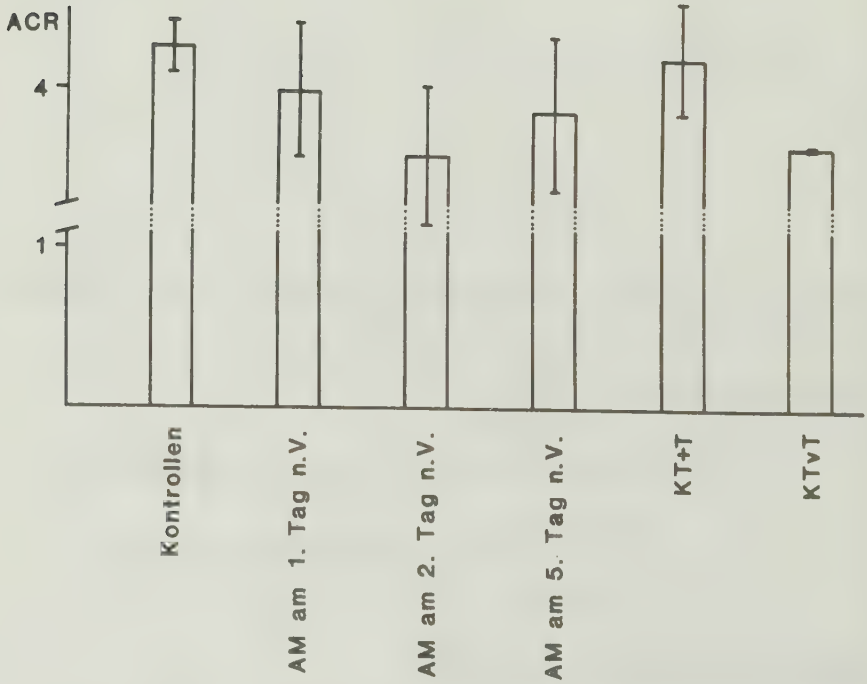

Abb. 15: Atmungskontrollkoeffizienten von Mitochondrien vorbehandelter Ratten (n=4-6)

	ACR
Kontrolle	4,27 ± 0,17
AM am 1. Tag n.V.	3,98 ± 0,43
AM am 2. Tag n.V.	3,58 ± 0,43
AM am 5. Tag n.V.	3,85 ± 0,48
KT+T	4,18 ± 0,35
KTvT	3,63 ± 0,08

Tab. 4: zugehörige Zahlenwerte zu Abb. 15

Aus der Succinatatmungsrate als Parameter für die Basisatmung der Mitochondrien wird deutlich, daß am 1. und 2. Tag nach Verbrennung die Atmungsaktivität der Lebermitochondrien im Vergleich zu Mitochondrien nicht vorbehandelter Tiere erhöht ist. Bei 5 Tage nach der Verbrennung aufgearbeiteten Tieren nimmt diese jedoch sehr deutlich ab. Nach statistischer Auswertung dieser Gruppe gegen die Kontrollgruppe bezüglich der Succinatatmungsrate mit Hilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben zeigte sich, daß sich die beiden Populationen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant unterschieden.

Die Atmungskontrollkoeffizienten waren trotz der anfänglich erhöhten Basisatmung bei allen 3 Versuchsgruppen, die der Verbrennung unterzogen worden waren, erniedrigt, wobei das Maximum der Reduktion am 2. Tag nach Verbrennung

zu finden war. Jede der 3 Gruppen wurde zusammen mit der Kontrollgruppe (nicht vorbehandelte Tiere) bezüglich der ACR-Werte einem t-Test für unverbundene Stichproben unterzogen. Bei einem Signifikanzniveau von 5 % konnte die Nullhypothese, daß die Erwartungswerte der Atmungskontrollkoeffizienten gleich sind, bei den am 2. Tag nach der Verbrennung isolierten Mitochondrien verworfen werden. Damit unterschied sich diese Versuchsgruppe bezüglich der Reduktion des ACR statistisch signifikant von der Kontrollgruppe.

Die oben gewonnenen Ergebnisse wurden durch die den Kreuztransplantationen unterzogenen Ratten deutlich bestätigt. So war die Atmungsaktivität der Tiere, denen das verbrannte Hautstück transplantiert worden war, im Vergleich zu denen, die das unverbrannte erhalten hatten, erhöht, während sich der Atmungskontrollkoeffizient genau umgekehrt verhielt. Die ACR-Werte der beiden Transplantationsgruppen wurden ebenfalls einem t-Test für unverbundene Stichproben unterzogen. Dabei waren bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % die Erwartungswerte ebenfalls signifikant unterschiedlich.

Schließlich wurden noch die ACR-Werte der Kontrolltiere und der Tiere mit unverbranntem Transplantat mit Hilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben getestet. Hier ergaben sich auf dem 5% Niveau keine signifikanten Unterschiede.

Zu den Atmungskurven verbrannter Tiere ist zu sagen, daß im Vergleich zu den Kontrolltieren die Gerade der Status 4 Atmung steiler verläuft, während die der Status 3 Atmung abgeflacht ist (Abb.16).

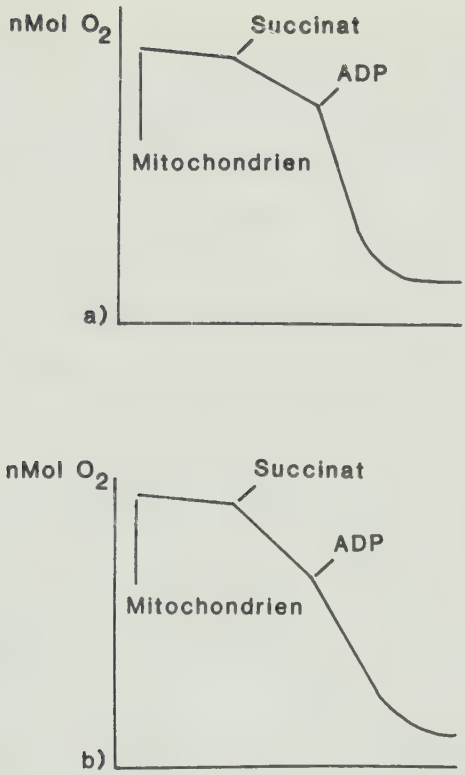

Abb. 16.a,b: Atmungskurven von Mitochondrien nicht vorbehandelter Tiere (a) und vorbehandelter Tiere (b)

5. D I S K U S S I O N

Die thermische Schädigung der Haut durchbricht die strenge Koordination der Stoffwechselschritte, die zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen nötig ist.

Obwohl die heutige moderne Intensivmedizin eine Therapie der Wasser-, Elektrolyt-, Eiweiß- und Wärmeverluste sowie der Wundinfektion möglich macht, konnte bisher lediglich der Todeszeitpunkt hinausgezögert werden, die Letalität jedoch ist noch immer erschreckend hoch (3 - 5).

Diese Tatsache führte dazu, daß bereits früher diskutierte Hypothesen über die Entstehung und Wirkung toxischer Substanzen nach Verbrennungen wieder verstärkt aufgegriffen wurden. Einige dieser Substanzen sind in der Einleitung aufgeführt (12 - 24). Bei diesen sogenannten Verbrennungstoxinen handelt es sich um Substanzen, die aus körpereigenem Gewebe durch die thermische Einwirkung entstanden sind.

In diesem Zusammenhang ist die folgende Überlegung von elementarer Bedeutung für die Spezifität der Verbrennungskrankheit. Sollte nämlich die Einwirkung thermischer Energie die Entstehung neuer Substanzen aus körpereigenem Gewebe mit toxischen Wirkungen induzieren, so wäre dieses Faktum mit der Spezifität der Verbrennungskrankheit gleichzusetzen. Würde jedoch das Bild der Verbrennungskrankheit durch eine Einschwemmung körpereigener Substanzen, die vor dem Trauma durch Diffusionsschranken abgetrennt waren, hervorgerufen, so wäre dieser Effekt auch ohne Einwirkung thermischer Energie, beispielsweise durch Permeabilitätsänderung nichttoxischer Genese, möglich gewesen. Damit wäre die Spezifität der Verbrennungskrankheit nicht gegeben.

Abgesehen von den eben beschriebenen Verbrennungstoxinen - der Begriff Toxin ist für die betreffenden Substanzen nicht immer glücklich gewählt - kommen natürlich auch nicht aus

körpereigenem Gewebe entstandenen Substanzen toxische Wirkungen und damit Bedeutung für die Verbrennungskrankheit zu. Hierzu kann die Überflutung des Organismus mit bakteriellen Exo- und Endotoxinen nach einer Superinfektion der Verbrennungsflächen genannt werden (7 - 9).

5.1. Atmungsmessungen an Mitochondrien nicht vorbehandelter Ratten

a) Direktinkubation mit trockenen Destillaten

Bruchelt (65) teilte die trockenen Destillate in 2 Fraktionen (20 - 150°C / 150 - 270°C) ein. Bei der Direktinkubation isolierter Rattenlebermitochondrien mit Fraktion 1 fand er eine starke Entkopplung. Fraktion 2 verhinderte eine Steigerung der Status 4 und Status 3 Atmung nach Succinat- bzw. ADP-Zugabe.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bruchelt'schen Untersuchungen erweitert und differenziert. Seine Fraktion 2 wurde in 2 Fraktionen aufgeteilt (140 - 200°C / 200 - 250°C) und es wurden verschiedene Versuchsansätze und Verdünnungen gewählt (siehe unter 4.1.a).

Bei allen 3 Fraktionen resultierte eine deutliche Reduktion der Atmungskontrollkoeffizienten im Vergleich zu den Kontrollen, wobei diese bei Fraktion 2 auch noch in einer Verdünnung von 1:5 voll erhalten blieb. Parallel dazu blieb die Status 4 Atmungsrate im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Ausnahme: Fraktion 1). Alle 3 Fraktionen haben also eine entkoppelnde Wirkung, wobei diese vom Zeitpunkt der Destillatzugabe im Atmungsmessungsverlauf fast gänzlich unabhängig war. Aufgrund der geringfügigen Reduktion der Succinatatmung durch Fraktion 1 könnte man hier zusätzlich zur Entkopplung einen geringen hemmenden

Effekt auf die Atmungskette oder oxydative Phosphorylierung diskutieren.

Von besonderem Interesse ist die ausgeprägt entkoppelnde Wirkung der Fraktion 2. Dies bedeutet nämlich, daß die leicht flüchtigen Substanzen mit der stärksten toxischen Wirkung bei Hautverbrennungen zwischen 140 und 200°C - zumindest am Versuchstier - entstehen.

Was die Verdünnungen der Destillate in den in-vitro-Versuchen angeht, so ist eine Übertragung dieser Verhältnisse auf die in-vivo-Situation nur schwer möglich. Man kann daher auch nicht sagen, ob in der Leber toxische Konzentrationen erreicht werden. Ebenso kann, was die Abschwächung der toxischen Wirkung von Fraktion 1 und 2 nach ca. 7 Tagen in vitro betrifft, nicht gesagt werden, ob es im Organismus ebenfalls zu diesem Effekt kommt.

b) Direktinkubation mit definierten Substanzen

In unserem Labor konnten aus bei 250°C verbrannter Mäusehaut die in dieser Arbeit eingesetzten definierten Substanzen aus der flüchtigen Fraktion der Abbauprodukte gaschromatographisch identifiziert werden. Die Wirkungen der definierten Substanzen auf die Mitochondrienatmung werden für jede Substanz einzeln abgehandelt.

Trimethylamin

Beim thermischen Abbau der Proteine und Aminosäuren entstehen Amine (S. 7). Bäuerlein und Mitarbeiter fanden 1978 eine hemmende Wirkung der längerkettigen Alkylamine auf die Atmungskette in Rinderherzmitochondrien (66).

Bei der Inkubation von Rattenlebermitochondrien mit Trimethylamin konnte bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsanordnung eine eindeutige Reduktion des Atmungskontrollkoeffizienten festgestellt werden, was

einer Entkopplung entsprechen würde. Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß nach Zusetzen von 10 µl Trimethylamin zu den Mitochondrien der pH-Wert auf 9.70 anstieg und der entkoppelnde Effekt auch in einer mit KOH auf pH 9,60 titrierten Reaktionslösung erzielt wurde. Der entkoppelnde Effekt von Trimethylamin könnte somit allein auf die basische Wirkung zurückzuführen sein, andererseits können aber andere toxische Wirkmechanismen nicht ausgeschlossen werden.

Carbondisulfid (Schwefelkohlenstoff)

Schwefelhaltige Verbindungen treten beim thermischen Zerfall der schwefelhaltigen Aminosäuren auf, die im Keratin der Haut besonders angereichert sind (S.7, 8).

Schwefelkohlenstoff hemmt Enzyme (Hydrogenasen, Oxydasen, Oxygenasen) und führt dadurch zu Einschränkungen im Intermediärstoffwechsel, besonders im oxydativen Fremdstoffumsatz der Leber. Die neurotoxische Wirkung bei einer CS_2-Vergiftung äußert sich in Symptomen wie Polyneuritiden, Neurasthenien, Psychosen, Krämpfen, in höherer Konzentration auch Pränarkosen und Narkosen. Lokale Einwirkung auf die Haut führt zu schweren Gewebsschäden (67,68).

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Atmungsmessungen kann eine deutlich entkoppelnde Wirkung von CS_2 auf Rattenlebermitochondrien festgestellt werden.

Methyläthylketon

Methyläthylketon gehört zur Klasse der Carbonylverbindungen. Diese können beim thermischen Abbau von Proteinen (S.8), Kohlenhydraten (S. 9) und Fettsäuren (S.10) entstehen.

Methyläthylketon hat neurotoxische, in hoher Konzentration narkotische Eigenschaften, führt bei längerem Kontakt mit der Haut zu Entfettung, Reizung und Dermatosen (bei empfindlichen Individuen) und ist ein Reizstoff der Schleimhäute, besonders der Nase und Augen (67,69).

Bei den Untersuchungen an Rattenlebermitochondrien bewirkte Methyläthylketon eine nicht so stark wie bei Trimethylamin, Carbondisulfid und Pyrrol ausgeprägte Reduktion des Atmungskontrollkoeffizienten. Die entkoppelnde Wirkung war dennoch offensichtlich.

Pyrrol

Pyrrole entstehen beim thermischen Abbau von Serin (70), während der Pyrolyse von Kohlenhydrat und Protein bei der Reaktion von Prolin mit Carbonylverbindungen (71) und über ein Imin als Zwischenprodukt (72,73).

Bei den Atmungsmessungen an Rattenlebermitochondrien erwies sich Pyrrol als effektiver Reduktor des Atmungskontrollkoeffizienten, was einer Entkopplung gleichkommt.

Was die Übertragung der in-vitro-Untersuchungen mit den definierten Substanzen auf physiologische Verhältnisse im Organismus angeht, so gilt auch hier das unter 5.1.a Gesagte.

5.2. Atmungsmessungen an Mitochondrien vorbehandelter Ratten

Vor der Diskussion der unter 4.2. aufgeführten Ergebnisse muß kurz die Arbeit von Aprille und Mitarbeitern besprochen werden (26). Diese erhielten bei an Rattenlebermitochondrien durchgeführten Untersuchungen folgende Ergebnisse. Die Atmungskontrollkoeffizienten waren bei 3 Tage nach Verbrennung aufgearbeiteten Ratten und Succinat als Substrat im Vergleich zu den Kontrollen (nicht vorbehandelte Tiere) auf 78 %, die Status 4 Atmungsraten auf 97,3 % reduziert.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden im Gegensatz zu Aprille die Ratten am ersten, zweiten und fünften Tag nach Verbrennung aufgearbeitet. Bei allen 3 Gruppen waren die Atmungskontrollkoeffizienten gegenüber den Kontrollen erniedrigt; es hatte also eine Entkopplung stattgefunden. Drückt man die gefundenen Werte

analog Aprille in %-Werten aus, so erhält man folgendes Bild:

Kontrollen	100 %
Atmungsmessungen am 1. Tag nach Verbrennung	93,2 %
Atmungsmessungen am 2. Tag nach Verbrennung	83,8 %
Atmungsmessungen am 5. Tag nach Verbrennung	90,2 %

Für die Status 4 Atmung gelten die folgenden %-Werte:

Kontrollen	100 %
Atmungsmessungen am 1. Tag nach Verbrennung	108,1 %
Atmungsmessungen am 2. Tag nach Verbrennung	114,5 %
Atmungsmessungen am 5. Tag nach Verbrennung	79,8 %

Anhand dieser Daten und der von Aprille läßt sich bei Ratten der Verlauf nach der Verbrennung interpretieren.

Die durch das Verbrennungstrauma bewirkte Entkopplung der Rattenlebermitochondrien nimmt bis zum 3. Tag zu, wobei eine statistische Signifikanz am 2. und 3. Tag gegeben ist. Bis zum 5. Tag hat sich dann die Kopplung der Mitochondrienatmung wieder etwas erholt. Nun tritt aber ein anderer pathologischer Effekt in den Vordergrund. Die Basisatmung der Mitochondrien, die am 1. und 2. Tag noch leicht erhöht war, ist am 5. Tag signifikant erniedrigt. Diese Hemmung der Atmungskette und / oder der oxydativen Phosphorylierung könnte für die im Spätstadium der Verbrennungskrankheit eintretende Letalität an Bedeutung gewinnen und letztendlich auch mitverantwortlich sein.

Um der eingangs der Diskussion aufgeworfenen Frage der Spezifität der Verbrennungskrankheit nachzugehen, wurden die Kreuztransplantationen durchgeführt. Die Ergebnisse seien noch einmal in prozentualen Werten angegeben:
Atmungskontrollkoeffizienten am 2. postoperativen Tag:

Kontrollen	100 %
Ratten mit unverbranntem Transplantat	97,9 % (100 %)
Ratten mit verbranntem Transplantat	85,0 % (86,8%)

Da sich die Ratten mit unverbranntem Hauttransplantat in Bezug auf die Atmungskontrollkoeffizienten nicht

signifikant von den Kontrollen unterschieden, kann eine operationsbedingte Entkopplung der Mitochondrien bei dem vorliegenden Verbrennungsmodell ausgeschlossen werden.

Dagegen waren die Atmungskontrollkoeffizienten der beiden kreuztransplantierten Populationen signifikant unterschiedlich. Somit kann davon ausgegangen werden, daß sich in dem verbrannten Transplantat toxische Substanzen befunden haben müssen, die via Kreislauf zur Leber gelangten und für die Entkopplung verantwortlich waren. In diesem Fall wäre die Verbrennung ein spezifisches Geschehen.

Die bei den vorgelegten Untersuchungen festgestellten Entkopplungen bedeuten, daß Substrate von den Mitochondrien ohne ADP-Phosphorylierung oxydiert werden. Die entstehende Energie wird als Wärme frei. Für die Stoffwechselleistungen der Zelle wie Proteinsynthese, Wachstum, Transport- und Reparaturvorgänge fehlt dann die dazu nötige Energie. Diese nutzlose Energieverschwendung korreliert mit dem nach Verbrennungen auftretenden Hypermetabolismus und der sich daran anschließenden Stoffwechselerschöpfung. Die mitochondriale Entkopplung als zelluläre Veränderung nach Verbrennung paßt auch zu Studien, die die Unfähigkeit des Organismus beschreiben, Energieverluste durch Verdunstung nach Verbrennungen zu reduzieren (74,75). Dennoch belegen Tierversuche, daß diese Art der Energieverluste den Hypermetabolismus nur zum Teil erklärt (76). Es wurde versucht, dieses Problem mit Hilfe von β - Blockern zu lösen, doch die Stoffwechselumsätze blieben erhöht (77).

Abschließend kann man sagen, daß die Entkopplung der Mitochondrien zwar zum oben beschriebenen Hypermetabolismus beiträgt, daß aber sicher noch andere Effekte, z.B. endokrine Prozesse (Steroidhormone) (78), nach Verbrennungen eine Rolle spielen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Als eine mögliche Ursache für die immer noch nicht abwendbare Spätmortalität nach schweren Verbrennungen gilt die Überflutung des Organismus mit toxischen Substanzen, die aus körpereigenen Geweben durch die Einwirkung thermischer Energie entstehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Bestandteilen verbrannter Haut und in-vivo-Hautverbrennungen auf den Leberstoffwechsel zu untersuchen. Als Testsystem wurden Lebermitochondrien der Ratte gewählt, Untersuchungsgröße war ihre Atmungsaktivität.

In Teil I der Arbeit wurden isolierte Mitochondrien mit trockenen Destillaten, Extrakten aus von 20 bis 250°C verbrannter Mäusehaut, sowie mit den bei der Verbrennung von Mäusehaut bei 250°C identifizierten Substanzen Trimethylamin, Schwefelkohlenstoff, Methyläthylketon und Pyrrol inkubiert.

Alle eingesetzten Substanzen erwiesen sich als biologisch aktiv und bewirkten eine starke Entkopplung der Mitochondrienatmung im Vergleich zur unbeeinflußten Kontrollgruppe.

In Teil II der Arbeit wurde Ratten ein ca. 90 cm^2 großes Stück der Rückenhaut bei 250°C verbrannt. Ihre Lebern wurden am ersten, zweiten und fünften postoperativen Tag zur Mitochondrienisolierung aufgearbeitet. Bei allen drei Gruppen konnte im Vergleich zu unverbrannten Tieren eine Entkopplung der Mitochondrienatmung festgestellt werden, wobei das Maximum am zweiten postoperativen Tag lag. Außerdem war die Atmungsaktivität am fünften postoperativen Tag signifikant erniedrigt.

Schließlich sollte noch der Frage der Spezifität der Verbrennungskrankheit mit Hilfe von Cross-Transplantationen zwischen verbrannten und unverbrannten Ratten nachgegangen werden. Die Aufarbeitung der Lebern erfolgte bei dieser Versuchsreihe am zweiten postoperativen Tag. Bei Tieren mit verbranntem Transplantat konnte gegenüber Tieren mit unverbranntem Transplantat eine signifikante Entkopplung der Mitochondrienatmung festgestellt werden.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Greuer, W.: Zur Pathophysiologie und Therapie der Verbrennungskrankheit. Beitr.klin.Chir.198,257-283 (1970)
2. Koslowski, L.: Kälte- und Wärmeschäden in : L.Koslowski, W. Irmer, K.A.Bushe : Lehrbuch der Chirurgie, Schattauer Verlag (1982)
3. Saur, K.,D. Schlosser, L. Schweiberer: Pathophysiologie und Therapie der Verbrennungen. Deutsch.Ärzteblatt 73, 1081 - 1088 (1976)
4. Koslowski, L.: Autolysekrankheiten in der Chirurgie, Stuttgart: Thieme (1959)
5. Baxter, C.R.: The Current Status of Burn Research. J. Trauma 14, 1-8 (1974)
6. Roe, C.F., J.N. Kinney:Water and Heat Exchange in Third Degree Burns. Surg. 56. 212 - 220 (1964)
7. Mac Millan, B., P. Edmonds, R.Hummel: Epidemiology of Pseudomonas in a Burn Care Unit. J. Trauma 13, 627 - 638 (1973)
8. Alexander, J.W.: Pseudomonas Infections in Man, Baltimore: Waverley Press Inc. p. 103 (1970)
9. Allgöwer, M., G.A. Schönenberger: Problems of Severely Burnt Patients. Bull. Soc. Int. Chir. 32, 287 - 296 (1973)
10. Koslowski, L.: Die Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit im Lichte neuerer Forschungsergebnisse. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 329, 880 - 888 (1971)
11. Wilmore, D.W.: Nutrition und Metabolism Following Thermal Injury. Clin. PLast. Surg. 4, 603 - 619 (1974)
12. Rosenthal, S.R.: Substances Released from the Skin Following Thermal Injury: "Burn Toxin". Surg. 46, 932 - 947 (1959)
13. Rosenthal, S.R., D.Zelman, C. Valenti, J.C. Song, B.E. Bromberg: In Vivo Evidence of a Burn Toxin. Plast.Reconstr.Surg. 43, 397 - 401 (1969)

14.Rosenthal, S.R., P.L. Hawley, A.A.Hakim: Purified Burn Toxic Factor an its Competetin. Surgery 71, 527 - 536 (1972)

15.Rosenthal, S.R., G.T.Crouse, W.A. Spurrier, K.C.Thadhani: Human "Burn Toxin" and In-Vitro-Produced "Anti-Toxin". Ann. N.Y. Acad.Sci. 792 - 806 (1968)

16.Baxter, C.R., W.A. Cook, G.T. Shires: Serum Myocardial Depressant Factor of Burn Shock. Surg. Forum 17, 1 - 2 (1966)

17. Baxter, C.R., J.A. Moncrief, M.D. Prager, L.S. Cohen: A Circulating Myocardial Depressant Factor in Burn Shock. In P. Matter, T.L. Barclay, Z. Konickova: Research in Burns. Bern, Stuttgart, Vienna: Huber, 499 - 502 (1971)

18.Fedorow, N.A., B.E. Mowschew, R.W. Nedoschiwina, W.N. Petrov, W.J. Awertschenko: Isolierung und Untersuchung toxischer Fraktionen verbrannter Haut. Vorpr.med.chim. 20, H 4, 371 - 375 (1974)

19.Mowschew, B.E.: Fractionation of Proteins of Normal and Burnt Skin by the Method of Gel Filtration (russ.). Patol. Fiziol.Eksp. 15, 317 - 341 (1971)

20.Cueni, L.B., M. Allgöwer, G.A. Schönenberger: Isolierung und physikalisch chemische Charakterisierung eines Verbrennungstoxins aus der Mäusehaut. Res.Exp.Med. 156. 110 - 128 (1971)

21.Schönenberger, G.A., M. Allgöwer, F. Burkhart, N. Müller, K. Städtler, P. Zellner; Pathogenetische Bedeutung eines spezifischen cutanen Verbrennungstoxins für Infektion und Spätmortalität nach schweren Verbrennungen. Zbl. Chrirurgie 99, 1089 - 1097 (1974)

22.Schönenberger, G.A., M. Allgöwer, B. Kremer, K. Städtler: Neue Gesichtspunkte zum Thema Verbrennungskrankheit. Chirurg 47, 582 - 585 (1976)

23. Schmidt, K.: Veränderungen der molekularen Struktur der Haut unter der Einwirkung thermischer Energie und ihre Bedeutung für das Verbrennungssyndrom. Habilitationsschrift Tübingen (1977)

24. Schmidt, K.: Thermal Decomposition Products of the Skin and their Possible Roles in Burn Disease. In: Burn Injuries. Ed. by Koslowski, L., K. Schmidt, R. Hettich. Schattauer Verlag, Stuttgart, 65 (1979)

25. Meyer, C.: Isolierung und Strukturaufklärung flüchtiger Reaktionsprodukte bei Hautverbrennungen. Inauguraldissertation Tübingen (1980)

26. Aprille, J.R., J.A. Hom, J. Rulfs: Liver and Skeletal Muscle Mitochondrial Function Following Burn Injury. J. Trauma 17, 279 - 288 (1977)

27. Leonhardt, H.: Histologie, Cytologie und Mikroanatomie des Menschen. Thieme Verlag Stuttgart (1977)

28. Rassner, G.: Atlas der Dermatologie und Venerologie. Urban und Schwarzenberg: München - Wien - Baltimore (1978)

29. Steigleder, G.K.: Dermatologie und Venerologie. Thieme Verlag Stuttgart (1981)

30. Schumacher, S.: Integument der Mammalier. In: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere I. Hrsg.: L. Bolk, E. Göppert, E. Kallius, W. Lubosch. Urban und Schwarzenbeck: Berlin - Wien (1931)

31. von Langer, K., C. Toldt.: Lehrbuch der systematischen und topographischen Anatomie. Wien, Leipzig: Braumüller (1915)

32. Koslowski, L., F. Krause: Kälte und Wärme. In: W. Siegenthaler: Klin. Pathophysiologie. Thieme Verlag Stuttgart (1976)

33. Stüttgen, G., H. Schäfer: Funktionelle Dermatologie. Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1974)

34. Koslowski, L.: Zur Pathophysiologie und Allgemeinbehandlung schwerer Verbrennungen - neuere Einsichten und Erfahrungen. Der Chirurg 41, 385 - 390 (1970)

35. Klein,U.: Untersuchungen zur chemischen Struktur und biologischen Wirkung eines toxischen Bestandteils verbrannter Haut. Inauguraldissertation Tübingen (1977)

36. v. Kothen, W.: Kleiderbrände und Verbrennungen. Med. Dissertation Tübingen (1976)

37. Städtler, K., M. Allgöwer, L. B. Cueni, G. A. Schönenberger: Pathophysiologische Untersuchungen an einem Verbrennungsmodell der Maus. Res. exp. Med. 158, 23 - 33 (1972)

38. Fujimaki, M., H. Kato, F. Hayase: Studies on Roasting Changes of Proteins. Part. I: Changes of Casein and Lysozyme during Roasting. Agr. Biol. Chem. 36, 416 - 425 (1972)

39. Bjarnason, J., K. J. Carpenter: Mechanisms of Heat Damage in Proteins. 2. Chemical Changes in Pure Proteins. Br. J. Nutr. 24, 313 - 329 (1970)

40. Hofmann, K., R. Hamm: Einfluß der Erhitzung auf Struktur und Zusammensetzung von Muskeleiweiß. Die Fleischwirtschaft 9, 1180 - 1182 (1969)

41. Hayase, F., H. Kato, M. Fujimaki: Chemical Investigation on the Changes in Lysozyme during Heating. Agr. Biol. Chem. 39, 1255 - 1262 (1975)

42. Kato, H., F. Hayase, M. Fujimaki: Major Volatile Components Formed from Casein during Roasting. Agr. Biol. Chem. 36, 951 - 959 (1972)

43. Heyns, K., R. Stute, H. Paulsen: Bräunungsreaktionen und Fragmentierungen von Kohlenhydraten. Carb. Res. 2, 132 - 149 (1966)

44. Prey, V., W. Eichberger, H. Gruber: Die thermische Zersetzung von D-Glucose. Teil 2: Die trockene Pyrolyse von D-Glucose im Stickstoffstrom. Die Stärke 2, 60 - 65 (1977)

45. Bryce, D.J., C.T. Greenwood: Die Stärke 15, S. 285 (1963) zitiert aus I.S. Fagerson: Thermal Degradation of Carbohydrates. J. Agr. Food Chem. 4, 747 - 750 (1969)

46. Kato, K.: Pyrolysis of Cellulose, III. Agr. Biol. Chem. 31, 657 - 663 (1967)

47. Sugisawa, H.: The Thermal Degradation of Sugars, II: The Volatile Decomposition Products of Glucose Caramel. J. Food Sci. 31, 381 - 385 (1966)

48. Prey, V., H. Gruber: Die thermische Zersetzung von D-Glucose.Teil 2: Die langsame Pyrolyse von D-Glucose unter Stickstoff. Die Stärke 3, 96 - 98 (1977)

49. Nawar, W.W.: Thermal Degradation of Lipids. A. Review. J. Agr. Food Chem. 17, 18 - 21 (1969)

50. Crossley, A., T.D. Heyes, B.J.F. Hudson: The Effect of Heat on Pure Triglycerides. J. Am. Oil Chem. Soc. 39, 9 - 14 (1962)

51. Yasuda, K., B.R. Reddy, S.S. Chang: Chemical Reactions Involved in the Deep Fat Frying of Foods IV. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 625 - 628 (1968)

52. Artmann, N.R.: The Chemical and Biological Properties of Heated and Oxidized Fats. Advanced Lipid Research, 245 - 331 (1969)

53. Guillaumin, R.: Modifications d'ordre chimique intervenant lors du chauffage des corps gras. Rev. frac. d. corps gras 7, 445 - 456 (1971)

54. Lien, Y.C., W.W.Nawar: Thermal Decomposition of Tricaproin. J.Am.Oil Chem. Soc. 50, 76 - 78 (1973)

55. Schatz, G.: Oxydative Phosphorylierung in Mitochondrien. Angew. Chem. 79, 1088 - 1099 (1967)

56. Schmidt, K.: persönliche Mitteilung (1982)

57. Green, D.E., R.F. Goldberger: Molekulare Prozesse des Lebens, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1971)

58. Lehninger, A.L.: Bioenergetik. Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen. Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage (1982)

59. Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie, Walter de Gruyter, 5. Auflage (1977)

60. Slater, E.C.: Application of Inhibitors and Uncouplers for a Study of Oxydative Phosphorylation. In: Methods in Enzymology, Vol. 55: Fleischer, S., L. Packer: Biomembranes, Bioenergetics, Oxydative Phosphorylation (1979)

61. Delieu, T., D.A. Walker: An Improved Cathode for the Measurement of Photosynthetic Oxygen Evolution by Isolated Chloroplasts. New Phytol. 71, 201 - 225 (1972)

62. Bachofer: Sauerstoffmessgerät. Ordner: Gruppe 5, Januar 1978, Nr. 409 (1978)

63. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.J. Farr: Protein Measurement with Folin Reagent. J.Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

64. Drews, G.: Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York, S. 110 (1968)

65. Bruchelt, G.: Untersuchungen über den Einfluß von Verbrennungstoxinen auf den Stoffwechsel isolierter Hepatozyten und Mitochondrien der Ratte. Dissertation Tübingen (1981)

66. Bäuerlein, E., H. Trasch: The Action of Long Chain n - Alkylamines on Coupled Respiration in Beef Heart Mitochondria. Hoppe Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie 359, S. 1054 (1978)

67. Henschler, D. (Hrsg): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: Begründung von MAK-Werten, Verlag Chemie

68. Wirth, W., G. Hecht, C. Gloxhuber: Toxikologie Fibel. Thieme Verlag Stuttgart (1971)

69. Browning, E.: Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents. Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York (1965)

70. Kato S., T. Kurata, R. Ishitsuka, M. Fujimaki: Pyrolysis of β - Hydroxy Amino Acids, Especially L - Serine. Agr. Biol. Chem. 34, 1826 - 1832 (1970)

71. Kobayasi, N., M. Fujimaki: On the Formation of N-Acetonylpyrrole on Roasting Hydroxyproline with Carbonyl Compounds. Agr. Biol. Chem. 29, 1059 - 1060 (1965)

72. Kato H., M. Fujimaki: Formation of N-Substituted Pyrrole - 2 - Aldehydes in the Browning Reaction between D - Xylose and Amino Compounds. J. Food Science 33, 445 - 449 (1968)

73. Shigematsu, H., T. Kurata, H. Kato, M. Fujimaki: Formation of 2(-5-Hydroxymethyl-2-Formylpyrrole-1-yl) alkyl acid Lactones on Roasting Alkyl-α - Amino Acid with D-Glucose. Agr. Biol. Chem. 35, 2097 - 2105 (1971)

74. Gump, F.E., JM. Kinney: Caloric and Fluid Losses through the Burn Wound. Surg. Clin. N. Amer. 50, 1235 - 1248 (1970)

75. Zawacki, BE., KW. Spitzer, AD. Mason: Does Increased Evaporative Water Loss Cause Hypermetabolism in Burn Patients ? Ann. Surg. 171, 236 - 240 (197o)

76. Aikawa, N., J.B. Caulfield, R.J.S. Thomas: Postburn Hypermetabolism: Relation to Evaporative Heat Loss and Catecholamine Level. Surg.Forum 26, 74 - 76 (1975)

77. Wilmore, D.W., J.M. Long, A.D. Mason: Catecholamines: Mediator of the Hypermetabolic Response to Thermal Injury. Ann. Surg. 180,653 - 669 (1974)

78. Schmidt, K.: persönliche Mitteilung (1983)

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACR	Atmungskontrollkoeffizient (acceptor control ratio)
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Atmungsmessungen
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetate)
h	Stunden
i.p.	intraperitoneal
KT+T	kreuztransplantierte Tiere mit unverbranntem Transplantat
KTvT	kreuztransplantierte Tiere mit verbranntem Transplantat
M	Mol
n.V.	nach Verbrennung
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Tris	Tris-Puffer: Tris - (Hydroxymethyl-) Aminomethan

LEBENSLAUF

02.03.1959	Hartmut Feifel geboren in Aalen als Sohn des Konrad Feifel und seiner Ehefrau Dorothee, geb. Schiele
1966-1969	Besuch der Grundschule in Aalen-Hofherrnweiler
1969-1978	Besuch des Schubart-Gymnasiums in Aalen: mathematisch-naturwissenschaftlicher Zug
03.05.1978	Reifeprüfung
18.09.1978	Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Universität Tübingen
09.10.1979	Naturwissenschaftliche Vorprüfung für Zahnärzte
18.03.1980	Beginn des Doppelstudiums Medizin
25.08.1981	Ärztliche Vorprüfung
01.10.1981	Zahnärztliche Vorprüfung
10/81-1/84	Abfassung der vorliegenden Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
24.03.1983	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.07.1983	Heirat mit Susanne Weag
12.06.1985	Zahnärztliche Prüfung
18.06.1985	Approbation als Zahnarzt
23.08.1985	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/85-4/86	Abfassung der Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde bei Prof. Dr. Dr. N. Schwenzer an der Abteilung für Kiefer- und Gesichtschirurgie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Tübingen: "Spätergebnisse nach primärer Osteoplastik bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten unter besonderer Berücksichtigung der Oberkieferentwicklung"
10/85-8/86	Praktisches Jahr in Tübingen
seit 8/86	Assistent an der Zahn-, Mund- und Kieferklinik des Städtischen Klinikums Karlsruhe bei Prof. Dr. Dr. S. A. Geiger
05.11.1986	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
13.11.1986	Approbation als Arzt
16.12.1986	Promotion zum Doktor der Zahnheilkunde